

Vanessa Filipa Florêncio Monteiro

Desenvolvimento de Nanopartículas para o Tratamento do Cancro

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor João Nuno Moreira e pelo Professor Doutor Sérgio Simões e apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra com o intuito de adquirir o Grau de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica. Este projeto foi desenvolvido no Centro de Neurociências e Biologia Celular, no grupo de Vetores e Terapia Génica, sob a Orientação do Professor Doutor João Nuno Moreira (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra) e Professor Doutor Sérgio Simões (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

Agradecimentos

Ao terminar esta dissertação não poderia deixar de expressar o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que esta fosse elaborada.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira, por ter aceite ser meu orientador, e por me ter recebido no seu grupo de investigação, os meus sinceros agradecimentos por todo o apoio prestado ao longo da realização deste projeto, na confiança depositada em mim, assim como, na revisão da dissertação.

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, quero agradecer pela participação neste projeto.

A todos os meus colegas do grupo Vetores e Terapia Génica do Centro de Neurociências e Biologia Celular, por todos os momentos de boa disposição que me possibilitaram e pela força que sempre me deram. Quero dar um agradecimento muito especial ao Nuno Fonseca, pela sua amizade, mas também pela grande ajuda e colaboração que me prestou ao longo de todo o trabalho. Quero ainda, agradecer à Ângela Fernandes e à Ana Gregório por me terem auxiliado sempre que necessitei, à Sarah Pagliaro, a colega de mestrado que para além de uma grande amizade, mostrou sempre o seu apoio e ainda à Susana Cecílio pelo carinho e pela força que me deu para enfrentar este desafio.

Quero ainda mostrar aqui o meu profundo agradecimento à minha família e amigos, por todo o apoio prestado ao longo de toda a minha carreira académica.

Aos meus pais e irmão, por todo o esforço que fizeram para que fosse possível realizar esta etapa, por toda a confiança que exerceram em mim, pelo apoio que sempre mostraram, um grande obrigado, sem vocês não seria possível de todo terminar esta fase da minha vida. O meu grande agradecimento, como não poderia deixar de ser, ao Héber, pelo apoio, força, paciência e compreensão que sempre mostrou durante todo este meu percurso.

Um enorme obrigado a todos vocês por existirem na minha vida e por terem de alguma forma contribuído para que esta etapa fosse concretizada.

Tabela de Conteúdos

Agradecimentos.....	I
Tabela de Conteúdos.....	II
Lista de Abreviaturas	IV
Lista de Tabelas.....	V
Lista de Figuras.....	V
Abstract.....	VI
Resumo	VIII
Capítulo I	1
Introdução	2
1.1. Biologia do Cancro.....	2
1.1.1. Cancro como doença multifatorial: desenvolvimento e progressão	2
1.1.2. Microambiente tumoral: contribuição para a progressão do tumor	5
1.1.2.1. Hipertensão Intersticial.....	6
1.1.2.2. Hipóxia e o microambiente ácido.....	7
1.1.2.3. Componentes celulares do estroma como suporte ao desenvolvimento tumoral	8
1.1.2.4. Células Estaminais Cancerígenas (CSC)	9
1.2. Conceitos para uma terapia direcionada para o cancro	10
1.2.1. Angiogénese	10
1.3. Estratégias baseadas em sistemas de entrega de fármacos: mudança de paradigma do tratamento em oncologia	11
1.3.1. Nanopartículas direcionadas de base lipídica	12
1.3.2. Lipossomas sensíveis ao pH	13
1.4. O Potencial da Combinação fármacos para o tratamento do cancro	15
1.4.1. Os efeitos adversos da quimioterapia.....	15
1.4.2. Terapias Combinadas – Benefícios e Perspetivas	15
1.5. Objetivos	16
Capítulo II	17

Materiais e Métodos.....	18
2.1. Materiais	18
2.1.1. Materiais	18
2.1.2. Cultura Celular.....	18
2.2. Métodos	18
2.2.1. Preparação dos lipossomas	18
2.2.1.1. Lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico	18
2.2.1.2. Preparação de lipossomas pelo método de Injeção de Etanol	19
2.3. Caracterização das nanopartículas.....	19
2.3.1. Estudos de entrega intracelular	20
2.3.2. Estudos de citotoxicidade	20
2.3.3. Estudo de viabilidade celular	20
2.3.4. Microscopia de Fluorescência	21
2.3.5. Análise Estatística	21
Capítulo III	22
Resultados e Discussão	23
3.1. Caracterização das nanopartículas.....	24
3.1.1. Análise das propriedades físico-químicas	24
3.1.2. Avaliação da capacidade de retenção do fármaco encapsulado	27
3.2. Avaliação da entrega intracelular de lipossomas contendo lípidos ativos	29
3.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas desenvolvidas.....	31
3.4. Avaliação do impacto das nanopartículas desenvolvidas na viabilidade celular	36
Capítulo IV.....	41
Conclusões e Perspetivas Futuras	42
Referências	44

Lista de Abreviaturas

ABC	<i>ATP-binding Cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AKT	Proteína cinase serina/treonina
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
Bid	<i>BH3 interacting domain</i>
CAPP	Proteína fosfatase ativada por lípidos bioativos
CHEMS	hemissuccinato de colesterol
CHOL	Colesterol
ECM	Matriz extracelular circundante
EPR	Efeito da Permeabilidade e Retenção
FBS	Soro fetal bovino
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico
HIF-1	Fator -1 induzível por hipóxia
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular
IL-8	Interleucina-8
L1	Lípido 1
L2	Lípido 2
LT	Lípido Total
MDA-MB-435S	Linha celular
MDA-MB-231	Linha celular de adenocarcinoma
MDR	Resistência a múltiplos fármacos
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
NK	<i>Natural Killer cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Índice de polidispersão
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PEG	Poli(etileno glicol)
P-gp	Glicoproteína-P
pSL	Lipossomas não-vetorizados
p[T]iSL	Lipossomas PEGuilados vetorizados
pDL111	Lipossomas não vetorizados com L1
p[T]iDL111	Lipossomas PEGuilados vetorizados com L1
pDL112	Lipossomas não-vetorizados com L1, com 1/2 da dose de fármaco
p[T]iDL112	Lipossomas PEGuilados vetorizados com L1, com 1/2 da dose de fármaco
pDL211	Lipossomas não-vetorizados com L2
p[T]iDL211	Lipossomas PEGuilados vetorizados com L2
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de Tabelas

Tabela I- Exemplos de nano-vesículas lipossomais multifuncionais.....	18
Tabela II- Valores da citotoxicidade na linha celular MDA-MB-231 após os tempos de incubação de 1 h, 4 h e 24 h.....	43
Tabela III- Valores da citotoxicidade na linha MDA-MB-435S após o tempo de incubação de 24 h.....	45

Lista de Figuras

Figura 1.1. Características do cancro e capacidades que este adquire para alcançar o seu desenvolvimento, sobrevivência e progressão.....	3
Figura 1.2. Células presentes no microambiente tumoral.....	6
Figura 1.3. Mecanismos hipotéticos da internalização e entrega intracelular de lipossomas sensíveis ao pH.....	20
Figura 3.1. Caracterização das nanopartículas encapsulando o agente quimioterapêutico e um dos dois lípidos ativos.....	32
Figura 3.2. Capacidade de retenção do fármaco pelas nanopartículas desenvolvidas.....	36
Figura 3.3. Ensaios de associação celular normalizados contendo, o lípido 1 ou o lípido 2.....	38
Figura 3.4. Ensaios de citotoxicidade utilizando lipossomas encapsulando o fármaco e um dos dois lípidos 1 ou 2, para a linha MDA-MB-231.....	41
Figura 3.5. Ensaios de citotoxicidade utilizando lipossomas encapsulando o fármaco e o lípido 1 para a linha MDA-MB-435S.....	44
Figura 3.6. Análise do impacto das nanopartículas encapsulando o fármaco e o lípido 1 na viabilidade celular.....	47
Figura 3.7. Análise microscópica da morfologia celular após incubação com as nanopartículas desenvolvidas.....	50

Abstract

Cancer is one of the most emergent diseases in twenty-first century, mainly affecting developed countries. Therapies of preference for treatment of cancer have been chemotherapy, radiotherapy or surgery, these being associated with a reduced rate of survival and significant side effects. In addition, often chemotherapy and radiotherapy are not sufficiently effective in eliminating the tumor, mainly given to the development of resistance to chemotherapeutic agents and radiation. In order to overcome such issue, drug combination has been pursued as fundamental strategy to simultaneously inhibit multiple pathways that regulate the processes underlying resistance and tumor progression, ultimately leading to dose reduction and consequently minimizing severe side effects associated with chemotherapy.

However, success is highly dependent on strategies that enable the delivery of a drug combination on site in a specific manner. Nanotechnology-based platforms for drug delivery, namely lipid-based nanoparticles, offer an interesting approach. These nanosystems enable proper control of drug pharmacokinetics and biodistribution, essential to guarantee that drugs reach tumor site simultaneously, while preventing extensive systemic toxicity. Therefore, in the present work we proposed two lipid-based PEGylated nanoparticles for the targeted delivery of drug combinations. Upon several modifications, a combination of a cytostatic with one of two bioactive lipids was encapsulated in the targeted nanoparticle.

As a proof of principle, the properties of the developed nanosystems were measured, including size, loading efficiency, and drug retention in different conditions as a measure of stability. Additionally, delivery and cytotoxic potential were assessed using triple negative MDA-MB-231 breast cancer cell line and the MDA-MB-435S cell line.

The results demonstrated that the developed formulations, containing the combination of cytostatic agent and either Lipid 1 or Lipid 2, share similar stability, however marginally lower than the formulation containing only the cytostatic. Importantly, the presence of bioactive lipids in liposome membrane did not impact the intracellular delivery as assessed by calcein-loaded liposomes. Additionally, it was demonstrated that the cytotoxic efficacy increased for combination-loaded liposomes when compared to liposomal cytostatic, a feature dependent on the incubation time, enabling a cell death above 90% in 24 h incubation period. Nonetheless, it was demonstrated that a liposomes co-encapsulating Lipid 1 and half of the amount of cytostatic performed similarly as controls encapsulating double the amount of the same agent. This is important as far as it could enable a reduction of dose of

chemotherapeutic agent administered, thus leading reduction of systemic toxicity with minimal compromise in efficacy. In conclusion, the results here presented represent an important contribution for the development of targeted delivery of drug combinations employing lipid-based nanosystems. Additionally, they unravel the way for targeted delivery of bioactive lipids combined with small drug chemotherapeutics.

Resumo

O cancro é uma das doenças mais emergentes do século XXI, manifestando-se principalmente nos países desenvolvidos. As terapias de eleição para o tratamento do cancro têm sido a quimioterapia, a radioterapia ou a cirurgia, estando estas associadas a uma taxa reduzida de sobrevivência e a efeitos secundários significativos. Para além disso, é com frequência que a quimioterapia e a radioterapia, não são suficientemente eficazes na eliminação do tumor, muitas vezes devido ao desenvolvimento de resistência aos agentes quimioterapêuticos e à radioterapia. De forma a superar tal problema, a combinação de fármacos tem sido prosseguida como estratégia para inibir simultaneamente múltiplas vias que regulam processos subjacentes à resistência e à progressão do tumor, tendo como objetivo final a redução das doses empregadas, minimizando os efeitos secundários graves associados à quimioterapia.

No entanto, o sucesso é muito dependente de estratégias que permitam a entrega da combinação de fármacos no local de uma forma específica. As plataformas nanotecnológicas para a entrega de fármacos, como é o caso dos lipossomas, oferecem uma abordagem interessante. Estes nanossistemas permitem o controlo adequado da farmacocinética e biodistribuição, essencial para garantir que os fármacos alcançam o local do tumor simultaneamente, prevenindo, ao mesmo tempo, uma elevada toxicidade sistémica. No presente trabalho, foram propostas duas nanopartículas PEGuiladas de base lipídica, para a entrega direcionada de combinações de fármacos. Após várias alterações, uma combinação de um cistostático com um dos lípidos bioativos, foi encapsulada em nanopartículas.

Como prova de princípio, as propriedades dos nanossistemas desenvolvidos foram avaliadas, através da determinação do tamanho, eficiência de encapsulação, e retenção do fármaco em diferentes condições, como medida de estabilidade. Além disso, a entrega e o potencial citotóxico foram avaliados utilizando uma linha de cancro da mama triplo negativa, MDA-MB-231, e uma outra linha celular, as MDA-MB-435S.

Os resultados demonstraram que as formulações desenvolvidas contendo a combinação do agente quimioterapêutico com o lípido 1 ou lípido 2, partilham uma estabilidade semelhante, embora ligeiramente mais baixa que a formulação contendo apenas o citostático. De salientar, a presença dos lípidos bioativos não interfere com a entrega intracelular, como foi avaliado através de lipossomas encapsulando calceína. Além disso, foi demonstrado que a eficácia citotóxica aumenta para os lipossomas contendo a combinação, comparativamente com o agente citostático lipossomal, uma característica dependente do tempo de incubação,

permitindo uma morte celular acima dos 90% num período de 24h de incubação. No entanto, foi demonstrado que lipossomas com o lípido I, co-encapsulando metade da quantidade de agente citostático, apresentam um efeito semelhante ao dos controlos encapsulando o dobro da dose do mesmo agente. Isto é importante na medida em que se pode reduzir a dose do agente quimioterapêutico administrado, conduzindo a uma redução da toxicidade sistémica, comprometendo minimamente a sua eficácia. Em conclusão, os resultados deste projeto representam uma importante contribuição para o desenvolvimento de combinações de fármacos direcionados utilizando nanosistemas à base de lípidos. Para além disso, estes desvendam o caminho para uma entrega direcionada de lípidos bioativos em combinação com fármacos quimioterapêuticos de baixo peso molecular.

Capítulo I

Introdução

Introdução

I.1. Biologia do Cancro

I.1.1. Cancro como doença multifatorial: desenvolvimento e progressão

Uma das doenças mais incidentes na sociedade atual é o cancro. Segundo o GLOBOCAN 2008, existiram cerca de 12,7 milhões de casos em 2008, e estimaram-se cerca de 7,6 milhões de mortes, constituindo um grave problema de saúde pública (Jemal, Bray et al. 2011). Devido aos hábitos que são praticados, a má alimentação, a falta de prática de exercício físico, a prática de fumar cada vez mais corrente, o excesso de radiação solar, associado ao facto do crescimento e envelhecimento da população, conduz, certamente, a um aumento do desenvolvimento de várias doenças, entre elas, o cancro (Thorling 1996).

O cancro está inserido numa classe de doenças onde células crescem e se dividem sem respeitar os limites normais, invadindo os tecidos saudáveis, podendo metastizar por vários órgãos. A origem do cancro continua um mistério, mas parece estar associada a diversas alterações genéticas que estão de alguma forma associadas à inibição de genes supressores tumorais ou à ativação de oncogenes (Weinberg 1988).

Os genes supressores tumorais são genes que codificam proteínas que inibem o crescimento celular, constituindo a *PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog)* um bom exemplo, cuja função é perdida muitas vezes por mutações ou mesmo deleções (Weinberg 1988; Vazquez and Devreotes 2006). Por outro lado, a ativação de oncogenes, tal como o *RAS (Rat Sarcoma)* envolve uma ou mais mutações com ganho de função, conduzindo a uma elevada taxa de proliferação das células (Coleman and Tsongalis 2006; Fernandez-Medarde and Santos 2011). Alguns dos genes supressores tumorais, têm como função regular enzimas que reparam o ADN que se encontra danificado, mas, uma vez mutados, perdem a capacidade de reparar certos erros genéticos, contribuindo assim para a acumulação de outras mutações e mesmo para a ativação de determinados oncogenes (Coleman and Tsongalis 2006). Para que as células se tornem malignas, é necessário acumularem várias mutações genéticas gradualmente, resultando na desregulação de várias vias de sinalização, dando possibilidade às células de adquirirem capacidades específicas (Coleman and Tsongalis 2006).

As capacidades que as células adquirem para conseguirem sobreviver, proliferar e metastizar foram resumidas em 2000 por *Hanahan e Weinberg* (Hanahan and Weinberg 2000). Estes,

descreveram seis características essenciais às células cancerígenas e que ditam o seu comportamento desregulado: autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais anti-proliferativos; capacidade de encontrar alternativa à apoptose; potencial replicativo ilimitado; ativação sustentada da angiogénese e invasão e metastização de tecidos. Passados todos estes anos, estes dois investigadores, racionalizaram novas capacidades demonstradas pelo cancro (Figura 1.1.) (Hanahan and Weinberg 2011).

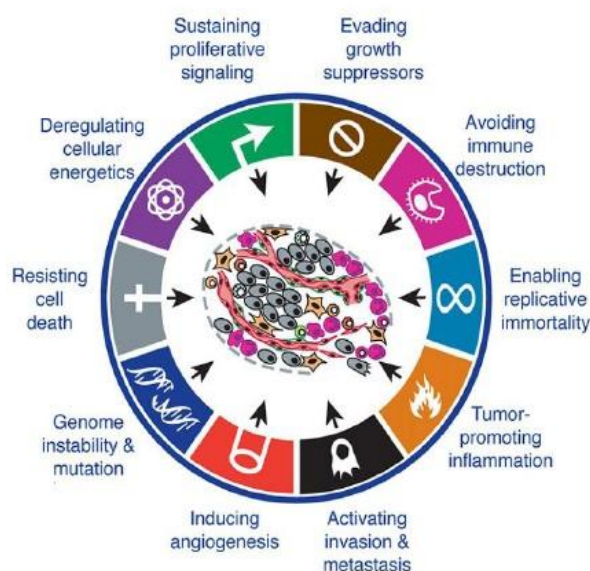


Figura 1.1. Características do cancro e capacidades que este adquire para alcançar o seu desenvolvimento, sobrevivência e progressão (adaptado de Hanahan *et al.*, 2011).

A inflamação associada ao cancro foi uma das novas características descobertas na última década. Esta contribui para que o cancro se torne ainda mais agressivo, promovendo o desenvolvimento do tumor (Colotta, Allavena et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011). No passado, pensava-se que a resposta imune atuava na erradicação do tumor, mas atualmente, sabe-se que as respostas imunes relacionadas com o tumor apresentam um efeito paradoxal, na medida em que estas reforçam o desenvolvimento e progressão do tumor, auxiliando as células do cancro a adquirirem várias características essenciais à sua sobrevivência. Tem portanto, sido descrito que as células imunes libertam moléculas bioativas, tais como fatores de crescimento e de sobrevivência e ainda fatores pro-angiogénicos e certas enzimas que modificam a matriz no ambiente tumoral, conduzindo à sua progressão, invasão e metastização (Colotta, Allavena et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011). Encontra-se descrito também, que estas células libertam determinados químicos, tais como espécies reativas de oxigénio (ROS) que muitas vezes dão origem a mutações (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007; Colotta, Allavena et al. 2009). Desempenhando um papel

fundamental no processo inflamatório, o sistema imunitário desempenha funções importantes no microambiente tumoral, porém não completamente entendidas ou definidas. Parece que alguns cânceros conseguem escapar à imunidade espontânea mas, por outro lado, parecem conseguir utilizar a maquinaria inflamatória do sistema imunitário usando-a em seu favor. Por outras palavras, anulam certos mecanismos imunitários, e criam um microambiente imunossupressor facilitador do desenvolvimento do tumor (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007).

Uma outra capacidade que as células do cancro apresentam é o desenvolvimento da instabilidade do genoma, que é adquirida através de alterações mutagénicas por mecanismos epigenéticos, como a modificação das histonas e a metilação do ADN (Negrini, Gorgoulis et al. 2010). A perda dos telómeros do ADN, que cria instabilidade cariotípica em conjunto com a amplificação ou deleção de segmentos de ADN, é também uma outra causa desta característica (Coleman and Tsongalis 2006). Esta capacidade define um défice na manutenção e reparação do genoma, ajudando o tumor a progredir e favorecendo a acumulação de vantagens fenotípicas que conduzem à transformação da célula (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007; Colotta, Allavena et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011).

Para que as células cancerígenas consigam proliferar descontroladamente é necessário adquirirem a energia necessária. Para tal, aquelas reprogramam o seu metabolismo energético, sendo este considerado outra característica fundamental das células cancerígenas (Tennant, Duran et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011). Devido ao ambiente caótico e à instabilidade que se sente no microambiente tumoral, a oxigenação é um processo deficiente. De forma a alcançarem a energia suficiente para os seus gastos, as células do cancro, incentivam a produção de maiores quantidades de glicose, recorrendo à glicólise (Tennant, Duran et al. 2009).

Estes resultados vão ao encontro da “Cancer Immunoediting Hypothesis”, onde existem apenas três palavras para descrever as várias fases do cancro. A eliminação é a primeira descrição, refere-se à imunovigilância do cancro, onde as células do sistema imune reconhecem e destroem tumores. O equilíbrio é a segunda fase do cancro, segundo esta hipótese, o sistema imunitário e o tumor estabelecem um equilíbrio dinâmico, que vai ajudar o cancro na sua evolução. E ainda, a fuga, que acontece depois da exaustão ou inibição do sistema imunitário ou da resistência das células do cancro ao sistema imune, onde o cancro consegue desenvolver-se e proliferar (Rabinovich, Gabrilovich et al. 2007; Colotta, Allavena et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011).

1.1.2. Microambiente tumoral: contribuição para a progressão do tumor

Nos últimos anos, a forma de olhar para um tumor mudou bastante. Atualmente, os tumores são vistos como órgãos muito complexos, capazes de ser ainda mais complexos que os tecidos normais. Anteriormente, a biologia do cancro era vista numa perspetiva reducionista, onde era apenas estudado pelos tipos celulares individuais. Neste momento, o cancro é compreendido como um sistema, como existindo um microambiente tumoral, onde o cancro não é apenas uma coleção de células que se dividem descontroladamente mas sim todo o ambiente onde estas células estão envolvidas (Hanahan and Weinberg 2011). De facto, participam ou interagem no tumor vários tipos de células, incluindo, as células endoteliais e os seus percursoros, células do músculo liso, pericitos, fibroblastos, miofibroblastos, linfócitos T e B, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, basófilos, células NK (Natural Killer), células dendríticas, macrófagos, entre outras (Colotta, Allavena et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011).

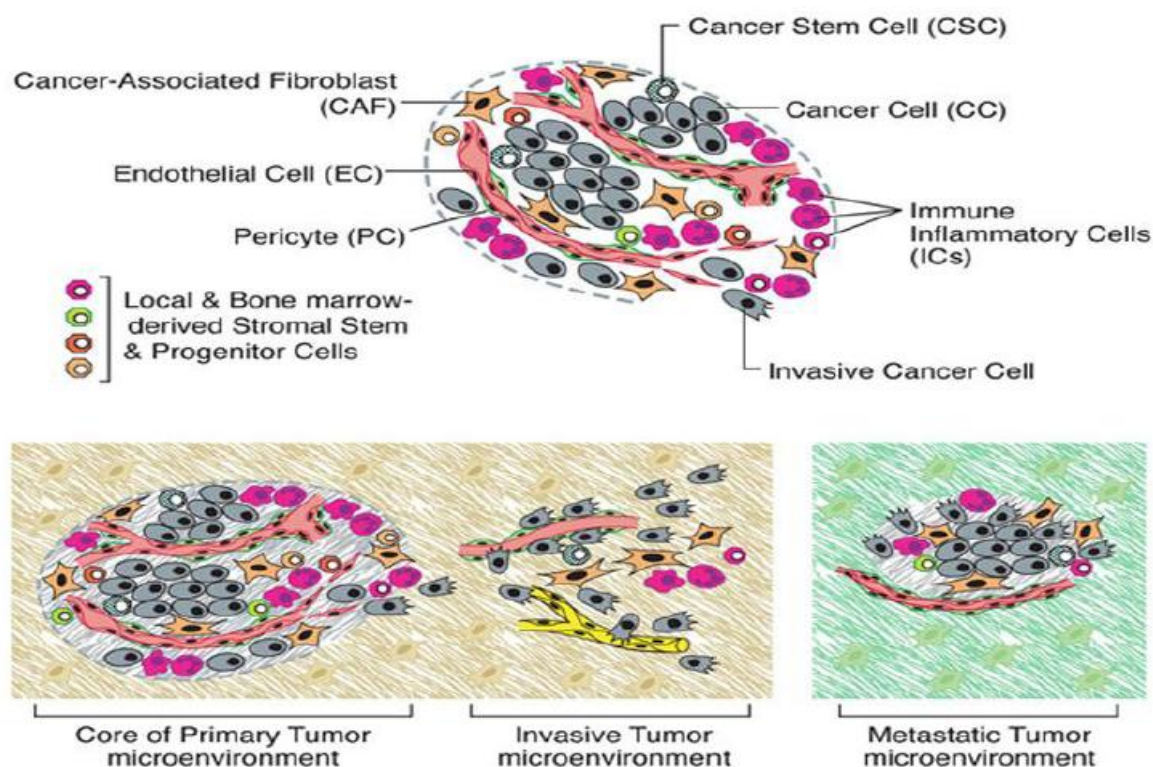


Figura 1.2. Células presentes no microambiente tumoral. (Em cima) Conjunto de distintos tipos de células constituintes da maioria dos tumores sólidos. (Em baixo) Os distintos microambientes dos tumores. Os múltiplos tipos celulares do estroma criam uma sucessão de microambientes tumorais que se alteram como tumores que invadem tecidos normais e posteriormente, como sementes colonizando tecidos distantes (Adaptado de Hanahan *et al.*, 2011).

A função que cada uma das células envolvidas neste microambiente tumoral apresenta, é específica dentro do tumor, oferecendo uma ajuda na progressão e invasão do tumor. Todas estas células atuam em conjunto de forma a favorecer a sobrevivência das células tumorais e, muitas vezes, auxiliando o processo metastático. Para que outros tecidos sejam alcançados, as células cancerígenas interagem com a matriz extracelular circundante (ECM), muitas vezes degradando-a, promovendo assim alterações na ligação daquelas com a ECM e células envolventes, conduzindo à invasão de tecidos normais (Polyak and Kalluri 2010; Hanahan and Weinberg 2011).

Ao longo dos anos de pesquisa nesta área têm-se verificado algumas mudanças a nível da composição da matriz extracelular, como o recrutamento de células do músculo liso, células do sistema imunitário e ainda a ativação de células mioepiteliais e fibroblastos. Este microambiente complexo envolve ainda outros fatores tais como a hipertensão intersticial, o baixo valor de pH extracelular, a hipóxia, a angiogénese, a interação de células do estroma com o tumor, ou as células estaminais cancerígenas. Todos estes fatores contribuem de alguma forma, para que o tumor se desenvolva, prolifere e metastize para órgãos saudáveis, constituindo assim, potenciais alvos terapêuticos no tratamento de tumores sólidos.

1.1.2.1. Hipertensão Intersticial

O interstício é uma matriz rica em colagénio e fornece suporte para os tecidos biológicos. Esta matriz ocupa o espaço entre as células e os tecidos e está também em contacto com as paredes dos vasos sanguíneos e com as membranas celulares. O interstício é constituído por um gel hidrofílico, composto pelo fluido intersticial e alguns constituintes macromoleculares, onde os proteoglicanos e o hialuronato são exemplos. No entanto, quando se fala do interstício tumoral, a sua constituição é um pouco diferente. Comparativamente aos tecidos normais, o espaço intersticial é cerca de três a cinco vezes maior, a condutividade hidráulica intersticial e a difusão são mais elevadas, a quantidade de líquido móvel é também superior, e ainda a dispersão dos agentes hidrofílicos é maior, resultante da convecção extravascular significativamente mais rápida (Danquah, Zhang et al. 2011). Os vasos linfáticos são essenciais para o bom funcionamento dos tecidos, pois são eles que efetuam o transporte do fluido intersticial e das células do sistema imunitário, mantendo o equilíbrio de fluidos no interstício dos tecidos. No tumor, os vasos linfáticos sofrem compressões através da tensão contínua oferecida pelas células tumorais e adotam uma função, conforme o local onde se encontram. Isto é, os vasos linfáticos que se apresentam na periferia funcionam

corretamente, os que estão no interior do tumor funcionam com defeito. Os fatores de crescimento responsáveis pela angiogénese são os mesmos que induzem a linfangiogénese. Os vasos linfáticos anormais, ao permitirem que as células tumorais invadam a periferia destes mesmos promovendo o processo metastático através da rede linfática, constituem mais um apoio ao sustento do tumor, tornando-se mais um obstáculo para o seu tratamento (Danquah, Zhang et al. 2011).

A fraca vasculatura tumoral e a disfunção linfática no interstício do tumor provocam também uma acumulação de conteúdos vasculares no tumor levando a hipertensão intersticial (Danquah, Zhang et al. 2011), (Jain 1987). É sabido que a pressão intersticial em tecidos normais é de cerca de 0 mm Hg, enquanto que na parte central do tumor, a pressão intersticial é de 100 mm Hg. Este fenómeno resulta numa redução de convecção através das paredes dos vasos sanguíneos tumorais em direção ao centro do tumor. Esta elevada pressão intersticial promove o movimento do fluido intersticial para os tecidos circundantes, provocando um afastamento de agentes terapêuticos aquando da sua administração. Todos estes fatores dificultam a ação de terapias sistémicas, particularmente na entrega de macromoléculas, já que estas necessitam do transporte convectivo transvascular para atravessar a barreira endotelial e progredir através do interstício (Danquah, Zhang et al. 2011).

1.1.2.2. Hipóxia e o microambiente ácido

Quando se fala em hipóxia no ponto de vista fisiopatológico, refere-se à condição em que os tecidos são desprovidos de oxigénio ou quando este é reduzido a níveis críticos, dificultando o funcionamento biológico de células e órgãos (Danquah, Zhang et al. 2011), (Hockel and Vaupel 2001). Enquanto nos tecidos normais o consumo de O_2 responde consoante as necessidades das células, nos tecidos neoplásicos há uma superior necessidade de consumir O_2 devido ao crescimento excessivo dos tumores. O facto da vasculatura tumoral ser anormal, também influencia o fluxo de sangue, reduzindo-o, levando a uma oxigenação deficiente da região tumoral. A condição de hipóxia no tumor leva à ativação da fator-1 induzível de hipóxia (HIF-1). Este participa na regulação da transcrição do gene ABC (ATP-binding cassette) de onde derivam os transportadores ABC, como o MDRI, MRPI e o ABCG2, parecendo ser clinicamente relevantes pela sua participação na resistência a múltiplos fármacos (MDR) (Peer, Karp et al. 2007). Desta forma, esta condição do tumor pode conduzir à resistência à quimioterapia, devido à sobreexpressão de genes que

codificam proteínas como glicoproteína-P (P-gp) cuja função é bombear os fármacos anticancerígenos para fora das células do cancro (Danquah, Zhang et al. 2011).

Uma outra característica que resulta da hipóxia devida à microcirculação anormal do tumor é a acidificação do microambiente tumoral (Fukumura and Jain 2007). O pH existente nos tumores é ácido, pois as células convertem ativamente glicose em ácido láctico (Danquah, Zhang et al. 2011). O ácido láctico e o ácido carbónico são fontes de prótons nos tumores e o seu aumento está na origem de um pH extracelular baixo (Fukumura and Jain 2007). Para além da glicólise aeróbia e anaeróbia, a hidrólise de ATP, a glutaminólise e a produção de dióxido de carbono são outros mecanismos que promovem a acidez no compartimento extracelular (Vaupel, Kallinowski et al. 1989; Danquah, Zhang et al. 2011).

O pH intracelular é distinto do pH extracelular, pois foi mostrado que o pH intracelular nas células tumorais é neutro/alcalino enquanto o pH extracelular é ácido. Esta diminuição de pH no meio extracelular pode constituir uma vantagem de ponto de vista terapêutico, isto porque, há uma maior facilidade de acumulação de fármacos pouco ácidos no tumor, como é o caso da mitomicina C, e ainda, na libertação de fármacos que são transportados em nanopartículas de base lipídica, que são estáveis a pH neutro mas sensíveis ao pH ácido, destabilizando-as e libertando o seu conteúdo (Danquah, Zhang et al. 2011).

I.1.2.3. Componentes celulares do estroma como suporte ao desenvolvimento tumoral

As células neoplásicas encontram-se dentro de um tecido de sustentação, o estroma. Este tem na sua constituição vários tipos de células, como os fibroblastos, pericitos, células do sistema imunitário, adipócitos, células endoteliais e entre outras. As interações regulares entre o tumor e as células do estroma têm demonstrado uma grande importância no desenvolvimento tumoral assim como na invasão de novos tecidos (Joyce and Pollard 2009). A necessidade de nutrientes por parte do tumor obriga ao recrutamento de células do estroma que, por sua vez, libertam citocinas e fatores de crescimento de forma a suprir as carências deste. Os fibroblastos são exemplos de células constituintes do estroma, mas quando estão associados ao cancro desempenham funções diferentes e são fenotipicamente distintos dos fibroblastos normais. Estes fibroblastos associados ao cancro produzem fatores de crescimento e metaloproteínases da matriz (MMP), contribuindo para a proliferação do tumor (Danquah, Zhang et al. 2011). Várias células do sistema imunitário também são recrutadas para o local do tumor através dos vasos sanguíneos ou linfáticos. Os macrófagos

são células do sistema imunitário que normalmente são atraídas para zonas tumorais necróticas ou em hipóxia, e aí libertam fatores pró-angiogénicos, fazendo o VEGF e a interleucina-8 (IL-8) parte dessa lista (Danquah, Zhang et al. 2011). Os macrófagos associados ao tumor, constituem uma população heterogénea. Existem duas populações distintas, os macrófagos classicamente ativados do tipo 1 (M1) e os macrófagos alternativamente ativados do tipo 2 (M2). Os macrófagos M1 ativados, fagocitam e destroem microorganismos, apresentam antígenos às células T para uma resposta imune adaptativa, produzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e eliminam células tumorais, através da segregação de fatores antiangiogénicos. Estas células são capazes de criar moléculas citotóxicas que atuam diretamente nas células tumorais, provocando a sua morte (Quatromoni and Eruslanov 2012). Os macrófagos M2, promovem a remodelação de tecidos e cicatrização de feridas, promovem a angiogénese através do VEGF e eliminam detritos, ou seja, ajudam a alimentar o crescimento e progressão do tumor (Danquah, Zhang et al. 2011; Quatromoni and Eruslanov 2012). Para tal, é necessário um conhecimento bastante alargado de todas interações entre as células do tumor e as diferentes células constituintes do estroma, quer na ajuda que estas células proporcionam ao desenvolvimento tumoral, quer à rejeição que estas também conseguem criar (Danquah, Zhang et al. 2011).

I.1.2.4. Células Estaminais Cancerígenas (CSC)

Para além das células estaminais existentes nos tecidos normais, existe evidência que existam células com características estaminais no ambiente tumoral onde desempenham funções de manutenção do desenvolvimento do tumor fornecendo novas células das diferentes linhagens. Estas células são chamadas de células estaminais do cancro (CSC) e encontram-se associadas aos componentes do estroma tumoral (Danquah, Zhang et al. 2011). Existem duas teorias acerca do crescimento tumoral, a teoria convencional e a teoria das CSC. A teoria convencional diz que as células presentes no tumor, são homogéneas e são todas tumorigénicas, enquanto que a teoria das CSC explica que existe uma subpopulação de células que sustentam o tumor, sendo estas as células estaminais do cancro (La Porta 2012). As CSC são portanto, uma subpopulação das células tumorais, que possuem as propriedades das células estaminais normais, de auto-renovação e de diferenciação. As CSC são consideradas a força motriz que permite o tumor crescer, uma vez que são as únicas células que se renovam indefinidamente, pelas suas propriedades de auto-renovação. Já as restantes

células que vivem no microambiente tumoral, têm a capacidade de proliferação e diferenciação limitada (Danquah, Zhang et al. 2011).

Baixos níveis de oxigênio têm mostrado um aumento da auto-renovação em células estaminais. Segundo um estudo por investigadores americanos, as CSC podem estar associadas à expressão do HIF, uma vez que este induz marcadores de células estaminais embrionárias humanas (Mathieu, Zhang et al. 2011). Como já referido acima, uma das características do microambiente tumoral é a hipóxia, sendo que o fator HIF é ativado, podendo ajudar na explicação da ação das CSC. Para além disso, as células estaminais do cancro parecem exibir as mesmas propriedades que as células estaminais normais, e portanto são resistentes às toxinas e a alguns fármacos, uma vez que expressam pelo menos um transportador de efluxo ABC (ATP-binding cassette) (Dean, Fojo et al. 2005). Estas bombas de efluxo existem normalmente nas células estaminais do cancro, elaborando mais um mecanismo de resistência a vários fármacos (Danquah, Zhang et al. 2011). Posto isto, as células estaminais do cancro constituem um alvo essencial com potencial para a quimioprevenção e o tratamento do cancro.

I.2. Conceitos para uma terapia direcionada para o cancro

Atualmente, acredita-se que uma terapia ideal para a remissão do cancro passa por um tratamento capaz de atingir a atividade de pelo menos uma via de sinalização essencial para a sobrevivência das células tumorais, de forma a não atingir as células saudáveis. Para tal acontecer, há necessidade de identificar os alvos moleculares que suportam essas vias de sinalização, entender como atingi-los, criando a possibilidade de inibir várias vias essenciais à sobrevivência das células cancerígenas, podendo retardar ou suprimir a doença.

I.2.1. Angiogénese

A angiogénese é o processo pela qual são formados novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, devido à exigência que o crescimento tumoral e metástases impõem (Atiqur Rahman and Toi 2003; Danquah, Zhang et al. 2011). No microambiente tumoral existem inúmeros fatores pró-angiogénicos que derivam das células neoplásicas, do estroma e de células infiltradas, afetando a angiogénese. Este tipo de angiogénese de extensão elevada, é descrita como sendo uma abundância de vasos sanguíneos imperfeitos ou defeituosos que

funcionam irregularmente e que são estruturalmente anormais, devido ao desequilíbrio de fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos (Fukumura and Jain 2007).

A angiogênese é um processo bastante complexo e regulado por vários fatores inibitórios e estimulatórios que modulam a migração e/ou proliferação das células microvasculares com o intuito de formar a tal nova neovasculatura (Lopes 2003). Os vasos sanguíneos constituem, portanto, um ótimo alvo, uma vez que eles representam um dos pilares que sustentam o tumor. Ao longo dos últimos anos, algumas terapias antiangiogênicas têm vindo a ser descobertas, encontrando-se algumas em aplicação clínica. As terapias antiangiogênicas conseguem inibir a proliferação e induzir a apoptose em células endoteliais, dependendo da potência do fármaco. Existem fatores de crescimento que regulam positivamente a angiogênese, como o VEGF, bFGF e o PDGF, e outros que a regulam negativamente, que são gerados pelo tumor, são eles, a endostatina, a angiostatina e entre outros (Folkman 2003). O VEGF é um dos mais importantes fatores angiogênicos que induzem a proliferação das células endoteliais, levando simultaneamente a um aumento da permeabilidade vascular (Wong, Prawira et al. 2009). Este aumento da permeabilidade vascular, devido à perda da cobertura de pericitos, permite a proliferação e migração de células endoteliais, levando à formação de nova vasculatura (Wong, Prawira et al. 2009). Um dos exemplos mais importantes do ponto de vista terapêutico recorrendo ao bloqueio da angiogênese mediada por VEGF foi a introdução do bevacizumab. O bevacizumab é um anticorpo monoclonal, que regula negativamente o VEGF. Este foi aprovado pela FDA, para o tratamento do cancro colo-retal numa combinação com o fluorouracil (5-FU) (Ferrara and Kerbel 2005). O bloqueio do VEGF pode portanto normalizar a vascularização do tumor, restabelecendo o equilíbrio entre fatores pró e antiangiogênicos, levando à supressão do aporte de nutrientes essenciais ao tumor (Danquah, Zhang et al. 2011).

I.3. Estratégias baseadas em sistemas de entrega de fármacos: mudança de paradigma do tratamento em oncologia

Os sistemas de entrega de fármacos podem providenciar uma série de vantagens, tais como, otimizar as propriedades farmacocinéticas do fármaco na corrente sanguínea e oferecer proteção contra a degradação, inativação e atividade prematura na viagem até ao alvo;

fornecer um maior controlo na cinética da entrega do fármaco; reforçar a absorção do fármaco no tecido selecionado (como no tumor sólido) (Peer, Karp et al. 2007).

Os parâmetro crucial das nanopartículas para definir a utilidade da entrega do fármaco incluem a estrutura dos materiais, a sua plasticidade, morfologia, tamanho, forma, carga, permeabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (Cuenca, Jiang et al. 2006; Peer, Karp et al. 2007).

1.3.1. Nanopartículas direcionadas de base lipídica

Os lipossomas e as micelas são vesículas de transporte nanotecnológicas de base lipídica. Estes veículos têm sido estudados com vista o tratamento de várias doenças, na tentativa de aumentar a solubilidade de agentes quimioterapêuticos e de reduzir a sua toxicidade. Nas investigações pioneiras, na área das nanopartículas constituídas por lípidos, existiam alguns problemas como a absorção pelo sistema mononuclear fagocítico (MPS), instabilidade, rápida depuração, limitando o potencial terapêutico destas nanopartículas. No entanto, lipossomas revestidos pelo PEG (polietilenoglicol), os quais ficaram conhecidos por lipossomas *Stealth*[®], demonstram um aumento da biodisponibilidade devido à reduzida captação pelo sistema MPS (Cuenca, Jiang et al. 2006). As partículas que são alteradas pela introdução do PEG têm a vantagem de estarem protegidas da deteção por parte do sistema mononuclear fagocítico, conduzindo a um aumento da meia-vida em circulação do fármaco encapsulado quando comparado com lipossomas não PEGuilados ou mesmo com o fármaco na forma livre, como é o caso da doxorubicina. Idealmente, o tamanho destas partículas não deve superar os 200 nm, uma vez que tal facilita o extravasamento através da vasculatura deformada do tumor (Nagayasu, Uchiyama et al. 1999; O'Shaughnessy 2003). Características como esta, associada ao tempo de circulação prolongado, dão a possibilidade de existir acumulação do fármaco nos tecidos com elevada permeabilidade vascular, como no tecido tumoral (O'Shaughnessy 2003). Os lipossomas, para acumularem no tumor sólido, tiram partido da sua vasculatura anormal, utilizando o efeito reforçado da permeabilidade e retenção (EPR). Este efeito depende das fenestrações endoteliais na vasculatura endotelial do tumor em conjunto com a incompleta cobertura de pericitos que admite o extravasar de macromoléculas e lipossomas com tamanho inferior a 200nm nos tumores, que associado a uma drenagem linfática debilitada, torna possível a sua retenção (Sapra and Allen 2003; Perche and Torchilin 2013).

Para além de todas as vantagens acima mencionadas, na utilização de nanopartículas à base de lípidos para entrega de fármacos, existe ainda uma outra mais-valia na utilização destas.

Estes permitem controlar e manter os rácios de combinações de fármacos *in vivo*, com o intuito de aumentar a atividade terapêutica (Dicko, Mayer et al. 2010). Tal capacidade poderá constituir uma estratégia promissora.

Tabela I- Exemplos de nano-vesículas lipossomais multifuncionais (Adaptada de Torchilin *et al*, 2013).

Encapsulated agent	Targeting ligand	Development stage
Doxorubicin	None	Approved (Doxil/Caelyx)
Vincristine	None	Approved (Marqibo)
Paclitaxel	None	Approved (Lipusu)
Cytarabine and daunorubicin	None	Phase I (CPX-351)
Irinotecan and floxuridine	None	Phase I (CPX-1)
PKN3 siRNA	None	Phase I (Atu-027)
Irinotecan	None	Phase I (NL CPT-11)
Doxorubicin	Stomach cancer-specific anti-GAH mAb	Phase I (MCC-465)
Oxaliplatin	Transferrin	Phase II (MBP-426)
Liposomal p53 DNA and docetaxel	Anti-Transferrin receptor scFv	Phase I (SGT53-01)
Doxorubicin	Thermoresponsive liposomes	Phase III (ThermoDox)
Doxorubicin	Cancer-specific 2C5 mAb	preclinical
Doxorubicin	Anti-CD22 mAb	preclinical
Paclitaxel	Anti-HER2 mAb	preclinical
Vincristine	mBAFF	preclinical
Oxaliplatin	Transferrin	preclinical
Daunorubicin	Transferrin and mannose	preclinical
Vinorelbine	NSCLC-specific peptide	preclinical
Doxorubicin	Metastasis-specific peptide	preclinical
Doxorubicin	MMP-2/9 detachable PEG	preclinical
Irinotecan	Folic acid	preclinical
Doxorubicin	Estrone	preclinical
Etoposide	Chondroitin sulfate	preclinical

I.3.2. Lipossomas sensíveis ao pH

Os lipossomas que manifestam propriedades de libertação do seu conteúdo respondendo a um estímulo apresentam aplicações com bastante potencial. Através da modulação da composição lipídica é possível formular lipossomas sensíveis a vários estímulos físicos e químicos, como à temperatura, à luz ou ao pH (Hafez, Ansell et al. 2000).

A sensibilidade dos lipossomas ao pH, permite a libertação do seu conteúdo em resposta ao ambiente ácido quer do tumor quer das vesículas endocíticas primárias aquando da endocitose da partícula na célula, como é o caso da promovida por diversos ligandos de vectorização (Hafez, Ansell et al. 2000). Para que os lipossomas se tornem sensíveis ao pH, há a necessidade de introduzir na sua composição determinados lípidos como dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), um lípido que preferencialmente, adota uma fase

hexagonal invertida (H_{II}), pouco compatível com a formação de bicamadas lipídicas; e um lípido como o hemisuccinato de colesterol (CHEMS), contendo um grupo ácido ionizável (Hafez, Ansell et al. 2000; Hafez and Cullis 2000). O mecanismo de ação do CHEMS passa pela estabilização do DOPE quando aquele se encontra na forma aniônica. Por acidificação do meio, quando o CHEMS se apresenta numa forma neutra, a sua propriedade de estabilização do DOPE é reduzida, dando ao DOPE a possibilidade de adotar a sua forma preferencial, promovendo assim a destabilização da membrana lipossomal, levando à libertação do conteúdo (Hafez and Cullis 2000). Sistemas lamelares DOPE/CHEMS podem portanto, ser preparados a pH neutro ou ligeiramente alcalino, mas quando em contacto com um pH ácido, estes sistemas tornam-se instáveis e fundem (Hafez and Cullis 2000). Lipossomas que contenham este sistema DOPE/CHEMS têm a capacidade de interagir, destabilizar, ou até mesmo fundir-se com as membranas-alvo (membrana plasmática ou endossoma), libertando com eficácia o material encapsulado, no citoplasma das células-alvo, tal tem sido descrito (Simoes, Moreira et al. 2004).

A figura 1.3. descreve de forma esquemática, como decorre a entrada dos lipossomas na célula e como esta liberta o seu conteúdo encapsulado. Esta estratégia surgiu através da observação de como determinados vírus encapsulados infetam células, e através do estudo do ambiente tumoral que é ácido, adaptando estes conhecimentos em nanopartículas (Simoes, Moreira et al. 2004).

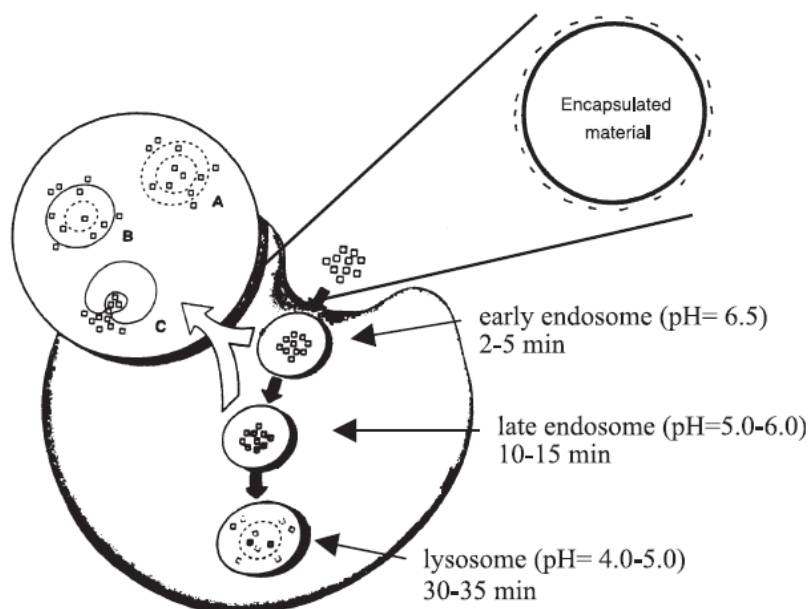


Figura 1.3. Mecanismos hipotéticos da internalização e entrega intracelular de lipossomas sensíveis ao pH (Adaptada de Simões *et al*, 2004).

I.4. O Potencial da Combinação fármacos para o tratamento do cancro

I.4.1. Os efeitos adversos da quimioterapia

Na corrente prática clínica, a quimioterapia é um dos tratamentos de eleição (para além da cirurgia e radioterapia) para a terapia do cancro, mas os casos que apresentam bons índices terapêuticos, com estes agentes quimioterapêuticos, são muito reduzidos (Rodon, Perez et al. 2010). Infelizmente, é com frequência que as células do cancro oferecerem resistência à quimioterapia, sendo uma das principais razões para o insucesso do tratamento (Rodon, Perez et al. 2010). Para tentar dominar esta limitação, são muitas vezes administradas as doses máximas permitidas, conduzindo a efeitos secundários adversos, devido à acumulação inespecífica nos tecidos saudáveis, ficando assim comprometida a eficácia do tratamento. Por estas razões, a combinação de terapias pode ser uma estratégia, que pode trazer benefícios ao permitir um aumento da eficácia, e simultaneamente uma diminuição da toxicidade associada.

I.4.2. Terapias Combinadas – Benefícios e Perspetivas

A quimioterapia convencional que é hoje em dia, a escolha de eleição para o tratamento de vários cancros, tem-se mostrado um tratamento muito agressivo, devido aos agentes quimioterapêuticos utilizados, e acoplado a isto, uma fraca qualidade de vida e baixa sobrevida (Lee and Nan 2012). Certos tratamentos combinados têm sido realizados e alguns aparentam ter um efeito aditivo ou sinérgico (Pinto, Moreira et al. 2009; Mendonca, Moreira et al. 2010; Pinto, Moreira et al. 2011). Os sistemas de entrega de fármacos, tais como os lipossomas, têm a capacidade de transportar agentes anticancerígenos e através de direcionamento ativo consegue atingir-se células do cancro especificamente (Lee and Nan 2012). A combinação de fármacos pode maximizar a morte celular, prevenir ou retardar o desenvolvimento de resistência celular e diminuir os efeitos colaterais que um agente único pode provocar (Rodon, Perez et al. 2010).

Portanto, as terapias combinadas parecem trazer vantagens e portanto, neste projeto tentou desenvolver-se uma estratégia vetorizada para a entrega intracelular de uma combinação de fármacos.

I.5. Objetivos

Tendo em conta o estado-da-arte, este projeto visou o desenvolvimento e produção de nanopartículas de base lipídica encapsulando uma combinação de fármacos, incluindo um citostático e lípidos bioativos, com características adequadas para administração intravenosa.

Capítulo II

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Materiais

A linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 e a linha MDA-MB-435S foram adquiridas através da *American Type Culture Collection* (Virginia, EUA). O agente quimioterapêutico foi obtido a partir da IdisPharma (Reino Unido). Os lípidos foram adquiridos através da Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, EUA).

2.1.2. Cultura Celular

As linhas celulares MDA-MB-231 e MDA-MB-435S foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, em RPMI-1640 (Sigma), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) (Invitrogen), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos lipossomas

2.2.1.1. Lipossomas preparados por hidratação do filme lipídico

Os lipossomas foram produzidos como descrito anteriormente (Daleke, Hong et al. 1990; Moreira, Gaspar et al. 2001; Ishida, Okada et al. 2006); Bolotin *et al*, 1994). Brevemente, prepararam-se três formulações de lipossomas: uma formulação base sem os lípidos bioativos e outras duas contendo um de dois lípidos ativos, lípido 1 (L1) ou lípido 2 (L2).

Os filmes lipídicos foram hidratados a 60°C com tampão aquoso. Após hidratação, todas as formulações foram extrudidas através de membranas de polycarbonato com diâmetro de poro de 80 nm a 200 nm utilizando um extrusor LipoFast Basic (Avestin, Canadá). Por forma a permitir o encapsulamento do agente citostático, o tampão foi trocado recorrendo a cromatografia de exclusão molecular, usando uma coluna Sephadex G-50 (Sigma). Este agente foi encapsulado ativamente durante 1,5 h a 60°C, na ausência de luz (Bolotin *et al*, 1994). O fármaco livre (não encapsulado) foi removido através de

cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna G-50 equilibrada com 25 mM de HEPES e 140 mM de NaCl (HEPES buffered saline, HBS), a pH 7,4.

2.2.1.2.Preparação de lipossomas pelo método de Injeção de Etanol

O filme lipídico de cada uma das formulações descritas anteriormente foi ressuscitado em etanol a 60°C. Lentamente, 40 µL da solução orgânica de lípidos foram adicionados, gota a gota, ao tampão de sulfato de amônio, durante vórtex enérgico, seguido de 30 s de vórtex e aquecimento das soluções a 60°C durante 1 min. Este passo foi repetido até que todo o lípido fosse adicionado ao tampão de sulfato de amônio. As formulações passaram num extrusor através de membranas de polycarbonato com poros de 50 nm ou 80 nm. Deste ponto em diante, foi realizado todo o processo descrito anteriormente para o método de hidratação de filme lipídico.

Para preparar lipossomas encapsulando calceína, o tampão de sulfato de amônio foi substituído por uma solução de calceína tamponada (pH 7,4). Após a extrusão como descrito em cima, a calceína livre foi separada recorrendo ao gel Sephadex G-50 equilibrado com HBS, sendo submetidos de seguida ao processo de pós-inserção.

2.3. Caracterização das nanopartículas

O tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão foram medidos por “dynamic light scattering” usando o analisador de tamanhos N5 (Beckman Coulter, Califórnia, EUA). A concentração final de lípido foi determinada após quantificação de fosfolípido, usando o kit "Phospholipids C" (Wako Chemicals, EUA), ou colesterol, usando o kit "Infinity Cholesterol" (ThermoScientific, Massachusetts, EUA).

O fármaco encapsulado foi determinado a 492 nm por interpolação em curva padrão após solubilização dos lipossomas em 90% de etanol absoluto. A eficiência de encapsulação (%) foi calculada usando a equação $[(\text{Fármaco/LT})_{\text{final}}/(\text{Fármaco/LT})_{\text{inicial}}] \times 100$. A retenção do fármaco foi avaliada incubando alíquotas de cada formulação em 90% tampão HBS (pH 7,4), 90% de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% FBS (Invitrogen) ou 90% de FBS, a 37°C. Adicionalmente, amostras das diferentes formulações foram incubadas em HBS pH 7,4 a 4°C. Às 0, 4 e 24 h, a fluorescência do fármaco foi medida a 485 nm (λ_{ex}) e a 590 nm (λ_{em}), usando um fluorímetro Spectramax (Molecular Devices, EUA). Libertação completa da doxorubicina foi realizada usando 0,25% (v/v) de Triton X-100. Retenção foi calculada usando a equação: $100 - [(\text{TestRFU}_n - \text{MeanRFU}_0)/(\text{MeanRFU}_{\text{ctr}} - \text{MeanRFU}_0)] \times 100$, sendo

TestRFU_n a fluorescência das amostras aos diferentes tempos, MeanRFU₀, fluorescência das amostras ao tempo 0 h e MeanRFU_{ctr}, fluorescência dos controlos de libertação completa.

2.3.1. Estudos de entrega intracelular

Para determinar a associação celular e a entrega intracelular do fármaco, 300 000 células das linhas MDA-MB-231 ou MDA-MB-435S foram incubadas com lipossomas não vetorizados ou vetorizados, encapsulando calceína a 40 mM (concentração à qual a fluorescência da sonda está marcadamente diminuída), a 37°C por 1 h e 4 h. Após lavagem com tampão PBS, as células foram destacadas e imediatamente analisadas por citometria num citómetro FACScalibur (BD Biosciences). No total foram colhidos 20,000 eventos que foram analisados com o *software* Cell Quest Pro (BD Biosciences).

2.3.2. Estudos de citotoxicidade

Para avaliar o potencial citotóxico de cada formulação, recorreu-se ao ensaio de citotoxicidade. Brevemente, 8000 células MDA-MB-231 foram incubadas com diferentes concentrações de formulações vetorizadas encapsulando, simultaneamente, rácios pré-determinados do agente quimioterapêutico e do Lípido 1 (p[T]iDL111 ou p[T]iDL112) ou do Lípido 2 (p[T]iDL211). Como controlo, foi incluída uma formulação vetorizada contendo apenas o agente quimioterapêutico (p[T]iSL). Adicionalmente, como termo de comparação, foram utilizadas as respetivas nanopartículas não vetorizadas. A incubação decorreu durante 1 h, 4 h, e 24 h ao fim das quais o meio de cultura foi renovado com meio sem fármaco, e as células mantidas até um total de 96 h. Após este período, a viabilidade celular foi avaliada recorrendo ao método de resazurina, como descrito (O'Brien, Wilson et al. 2000; Gomes-da-Silva, Ramalho et al. 2013).

2.3.3. Estudo de viabilidade celular

De forma a adquirir algum conhecimento acerca do mecanismo de ação das nanopartículas, 35000 células MDA-MB-231 foram incubadas com formulações vetorizadas, encapsulando simultaneamente rácios pré-determinados do agente quimioterapêutico e do Lípido 1 (p[T]iDL111 ou p[T]iDL112) ou Lípido 2 (p[T]iDL211), numa concentração de agente quimioterapêutico de 1 µM durante 4 h. Como controlo, foi incluída uma formulação vetorizada contendo apenas o fármaco (p[T]iSL). Adicionalmente, como termo de comparação, foram utilizadas as respetivas nanopartículas não vetorizadas. Ao fim deste tempo, o meio foi trocado e a experiência foi prolongada por 92 h. Após este período, as

células foram incubadas com Anexina V-PE (Calbiochem) e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Sigma) durante 10 min, à temperatura ambiente, e imediatamente analisadas por citometria no FACScalibur (BD Biosciences). Foram recolhidos 15,000 eventos.

2.3.4. Microscopia de Fluorescência

As linhas celulares utilizadas foram as MDA-MB-231 e MDA-MB-435s. Estas foram incubadas com as várias formulações acima descritas, durante 4 h a uma concentração de 1 μ M de agente quimioterapêutico. Após 96 h de ensaio, as células foram lavadas várias vezes com PBS, fixadas com PFA a 4% e marcadas com DAPI (Applichem; Alemanha). De seguida, foram capturadas imagens de fluorescência recorrendo um microscópio Axiovert 200M (Carl Zeiss) controlado pelo software AxioVision (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram posteriormente analisadas para quantificação e análise da morfologia dos núcleos utilizando o *software* Fiji (NIH, EUA).

2.3.5. Análise Estatística

Nas experiências quantitativas, os dados são apresentados como média \pm SEM. A análise estatística das diferenças entre os grupos experimentais e controlos foram realizados através de *one-way* ou *two-way* ANOVA. As diferenças encontradas só foram consideradas significativas se estas apresentaram um *P* value <0.05 .

Capítulo III

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

O cancro é um dos problemas de saúde mais correntes da sociedade atual. As formas que atualmente existem para o controlar são a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia, que são extremamente agressivas e dolorosas para o doente. Há necessidade de desenvolver uma forma mais direcionada, com menos efeitos nefastos e com uma eficácia aumentada.

Tem sido reconhecido que a aplicação eficaz de terapias combinadas estará dependente da identificação de compostos que, quando combinados, interajam sinergicamente sem extensa toxicidade sistémica (Ramaswamy 2007). Alguns investigadores têm tentado desenvolver terapias combinadas para inibirem simultaneamente várias vias que regulam a promoção do desenvolvimento tumoral, de modo a apresentar uma maior eficácia e uma menor toxicidade para o doente. Foi demonstrado que a combinação da ciprofloxacina com a doxorubicina ou com o docetaxel apresentava um efeito sinérgico ou aditivo em duas linhas de cancro da próstata. De maneira análoga, a mitoxantrona em conjunto com o imatinib também apresentavam uma maior eficácia *in vitro* contra modelos de cancro da próstata (Pinto, Moreira et al. 2009; Pinto, Moreira et al. 2011). Adicionalmente, foi demonstrado que a combinação do siRNA anti-BCR-ABL em conjunto com o imatinib mostrava um efeito sinérgico no tratamento da leucemia resistente ao imatinib (Mendonça, Moreira et al. 2010).

Baseado no conhecimento anterior, propôs-se o desenvolvimento de nanopartículas vetorizadas contendo uma combinação de um agente quimioterapêutico e com uma de dois lípidos bioativos.

3.1. Caracterização das nanopartículas

3.1.1. Análise das propriedades físico-químicas

A investigação ativa na área da nanotecnologia, tem levado a um conhecimento mais profundo acerca da influência das propriedades das nanopartículas na sua ação. Existem portanto, muitos parâmetros a ter em conta para que este se torne um excelente fármaco sendo que um dos mais importantes é o tamanho médio da nanopartícula (Nagayasu, Uchiyama et al. 1999; Peer, Karp et al. 2007; Wang, Langer et al. 2012). Nanopartículas com tamanho inferior a 200 nm, apresentam um conjunto de características que proporcionam a sua acumulação preferencial em tumores sólidos: maior facilidade para extravasarem através dos vasos sanguíneos, em particular dos tumores sólidos que apresentam uma estrutura deficiente (fenestrações) e em contraste com a generalidade dos vasos sanguíneos dos tecidos sãos; tempo de meia-vida na circulação sanguínea aumentado; e ainda, uma maior possibilidade de não serem reconhecidas pelo sistema mononuclear fagocitário (MPS), alcançando assim o local alvo (Senior 1987; Lasic 1998; Nagayasu, Uchiyama et al. 1999; Sapra and Allen 2003; Fukumura and Jain 2007).

De forma a caracterizar as nanopartículas desenvolvidas, procedeu-se à determinação de tamanhos médios e do seu índice de polidispersão e ainda, ao cálculo da eficiência de encapsulação do agente quimioterapêutico. Os resultados obtidos mostram que as nanopartículas apresentam tamanhos médios reduzidos, uma eficiência de encapsulação elevada, apenas apresentando alguma inconsistência na homogeneidade de distribuição de tamanhos, facto que depende da formulação (Figura 3.1). É de facto, essencial conseguir produzir lipossomas de baixo tamanho médio, e, preferencialmente, com uma distribuição homogénea. Na figura 3.1.A, apresentam-se os tamanhos das partículas, onde se observam diferenças estatisticamente significativas entre a formulação p[T]iSL Ctr e todas as outras formulações vetorizadas, mostrando claramente que o método de preparação dos lipossomas (hidratação de filme lipídico *versus* injeção de etanol) tem influência no tamanho média final das partículas, proporcionando o método de injeção de etanol uma redução clara no tamanho final das nanopartículas. As formulações pSL Ctr e p[T]iSL Ctr correspondem a formulações desenvolvidas a partir do método de hidratação do filme lipídico, em que a primeira e a segunda são não vetorizadas e vetorizadas, respetivamente. Estas servem como um controlo de comparação com o método de injeção de etanol.

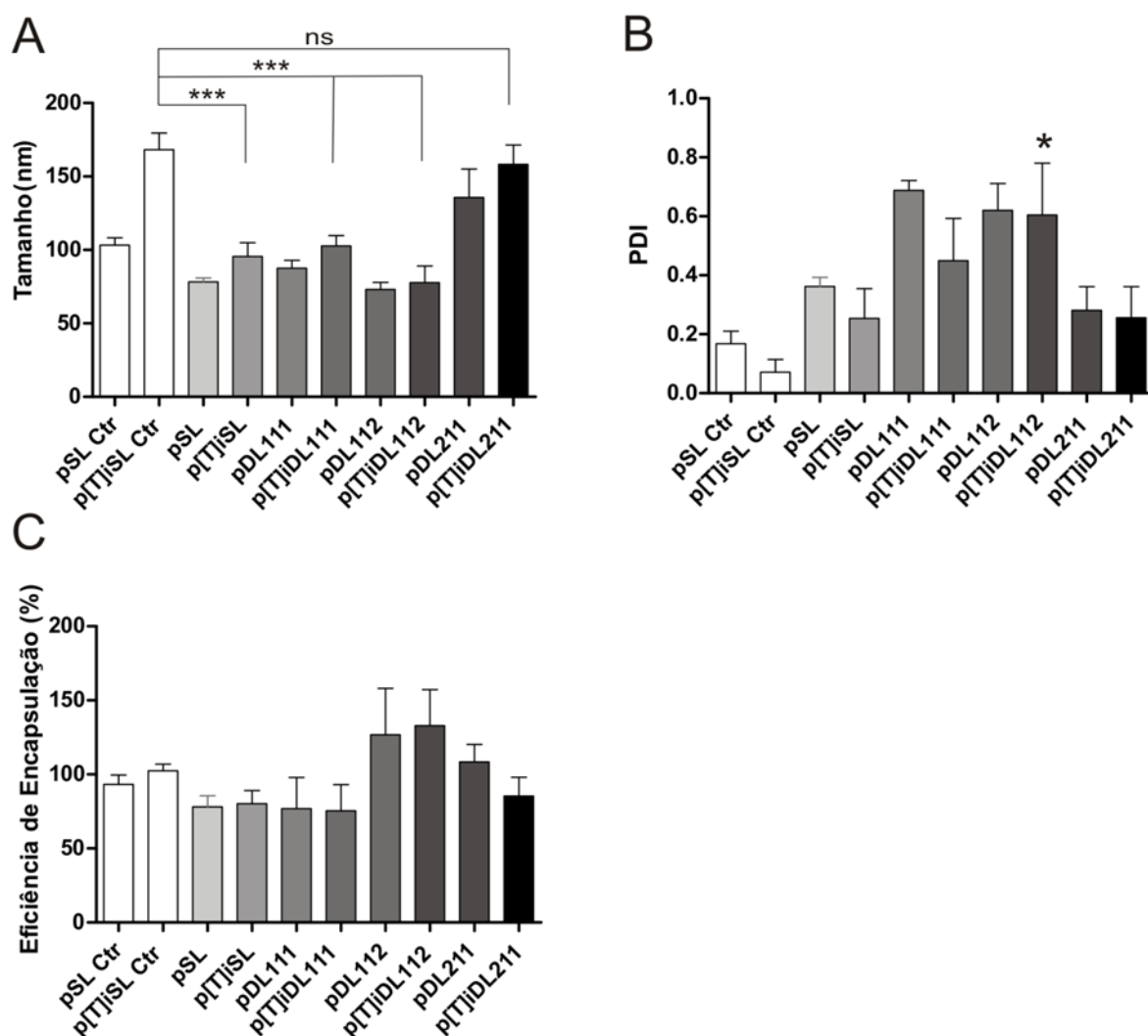


Figura 3.1. Caracterização das nanopartículas encapsulando o agente quimioterapêutico e um dos dois lípidos ativos. (A) Representa o tamanho médio das nanopartículas. (B) Representa o índice de polidispersão (PDI), como medida da homogeneidade da distribuição de tamanhos (PDI<0,3 é indicativo de suspensão de nanopartículas homogênea) (C) Representa os dados de eficiência de encapsulação do agente quimioterapêutico para cada uma das formulações testadas, calculado de acordo com o descrito na secção de Materiais e Métodos. Os dados representam a média \pm SEM de 3-7 experiências. *** $p<0,001$; * $p<0,05$; ns $p>0,05$ determinado usando o teste estatístico *One-Way ANOVA*. **pSL Ctr e p[T]iSL Ctr** – lipossomas preparados por hidratação de filme lipídico encapsulando o citostático, não vetorizados e vetorizados, respetivamente. As restantes formulações foram preparadas por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL** – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL111** e **p[T]iDL111** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL112** e **p[T]iDL112** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL211** e **p[T]iDL211** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L2 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente.

Os dados mostram que as formulações, apresentam um maior tamanho médio, mas tal era expectável devido aos componentes superficiais de maior peso molecular. Portanto, segundo

a Figura 3.1.A, todas as formulações, exceto as pDL2II e p[T]iDL2II, apresentam um tamanho inferior a 100 nm, o que é essencial para tirar partido das propriedades da vasculatura tumoral, mediante administração sistémica (Fukumura and Jain 2007). As formulações com Lípido 2 (L2) apresentam um tamanho superior ($135,5 \pm 38,5$ nm e de $158 \pm 22,8$ nm para a formulação não vetorizada e para a formulação vetorizada, respetivamente), porém abaixo dos 200 nm, o que pode dever-se ao parâmetro de empacotamento dos lípidos e ao aumento da temperatura de transição, que por conseguinte, irá tornar a membrana lipídica menos fluída e assim dificultar o processo de extrusão.

A figura 3.1.B., referente aos valores do índice de polidispersão, indica que formulações não vetorizadas, apresentam um valor de PDI mais elevado do que as que as vetorizadas, parecendo indiciar que estas apresentam uma estabilidade adicional. Maitani e a sua equipa, mostraram que lipossomas realizados pelo método de injeção de etanol se tornavam mais pequenos e mais homogêneos (Maitani, Igarashi et al. 2007), o que está de acordo com dados apresentados. Ainda, alguns investigadores afirmam que dispersões de alguns lípidos bioativos para além de aumentarem o tamanho da vesícula também tornam a amostra heterogênea. Tal está de acordo com os dados da figura 3.1B referentes ao Lípido I (LI). Porém, os lipossomas contendo o L2 apresentam valores de PDI semelhantes aos controlos (p[T]iSL e pSL). Tal poderá ser explicado com alguma estabilidade conferida pelo L2. Se por um lado, o elevado empacotamento dificulta o processo de extrusão, conduzindo a partículas maiores, por outro lado, permite uma maior estabilidade à membrana do que a conferida pela Lípido I (peso molecular mais baixo, incute maiores deficiências no empacotamento (Jain 1987). Isto levará a uma minimização da agregação, o que poderá não acontecer no caso do LI, levando às diferenças observadas no PDI.

No gráfico C da figura 3.1., apresentam-se os valores de eficiência de encapsulação, que se encontram bastante semelhantes entre todas as formulações, não havendo portanto quaisquer diferenças significativas. Tal demonstra que a introdução dos lípidos bioativos tem um impacto muito pequeno no encapsulamento do fármaco, sendo especialmente semelhante entre o fármaco lipossómico preparado por injeção de etanol (pSL e p[T]iSL) e os lipossomas contendo a combinação (pDLIII e p[T]iDLIII).

3.1.2.Avaliação da capacidade de retenção do fármaco encapsulado

Um outro aspeto a ter em conta será a capacidade das nanopartículas reterem o fármaco encapsulado aquando da administração sistémica. Há que garantir que o fármaco só será libertado no local alvo, isto é, no interior da célula cancerígena, já que existe a vantagem deste ir encapsulado e direcionado. De forma a ter uma indicação acerca deste aspeto essencial, foram realizados estudos de retenção, por forma a medir a libertação do agente citostático em diferentes condições. Este parâmetro é realmente importante e pretende saber-se se a constituição lipídica das nanopartículas, consegue garantir que a carga contida nos lipossomas só será libertada aquando o alvo pretendido for atingido.

Pode observar-se na figura 3.2.A que, quando em HBS e a 4°C, não existe libertação do fármaco ao longo do tempo para qualquer uma das formulações testadas, um resultado em tudo semelhante aquando da incubação em HBS a 37°C (figura 3.2B). Em meio RPMI suplementado com 10% de FBS (figura 3.2.C), a capacidade de retenção do fármaco, é inferior para as formulações que contêm o LI quando comparado com os controlos, nomeadamente a que apresenta metade da quantidade de fármaco encapsulado (pDLI 12), problema que é acentuado quando a partícula é vetorizada (p[T]iDLI 12).

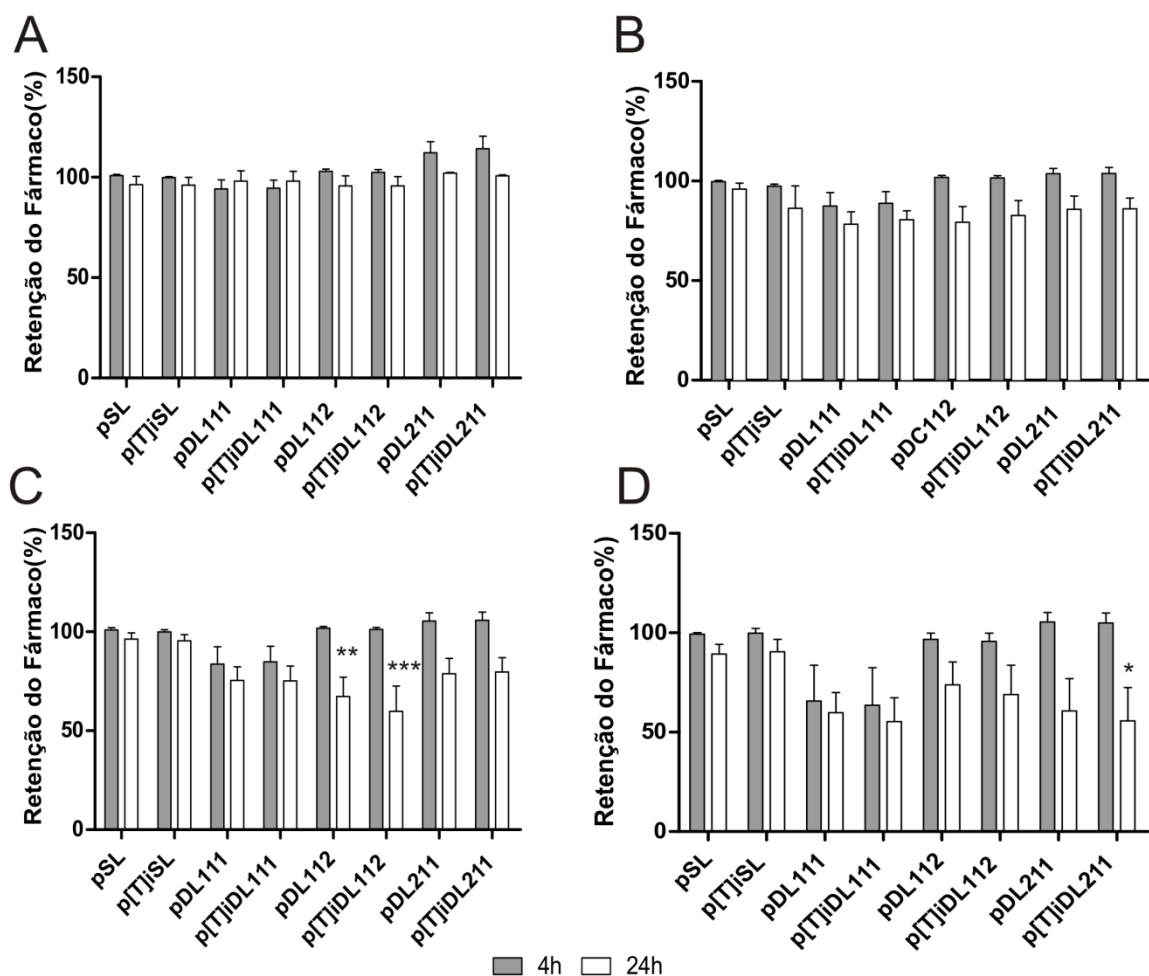


Figura 3.2. Capacidade de retenção do fármaco pelas nanopartículas desenvolvidas. A- Retenção do fármaco em HBS a 4°C. B- Retenção do fármaco em HBS a 37°C. C- Retenção do fármaco em meio RPMI 1640 suplementado com 10% FBS. D- Retenção do fármaco em FBS. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experiências. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; determinado usando o teste estatístico *Two-Way ANOVA*, comparando o resultado do tempo de incubação de 4 h com o resultado do tempo de incubação 24 h. As formulações foram preparadas por injeção de etanol: pSL e p[T]iSL – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; pDL111 e p[T]iDL111 – lipossomas encapsulando o rácio citostático: L1 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; pDL112 e p[T]iDL112 – lipossomas encapsulando o rácio citostático: L1 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; pDL211 e p[T]iDL211 – lipossomas encapsulando o rácio citostático: L2 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente.

Por outro lado, em FBS, é evidente uma tendência para haver libertação do fármaco encapsulado ao longo do tempo por parte de todas as formulações contendo os lípidos ativos, quando comparado com os controlos correspondentes (figura 3.2D). No entanto, é visível que as formulações contendo, quer L1 quer L2, retêm o fármaco durante 4 h na mesma extensão que os controlos, exceto as formulações pDL111 e p[T]iDL111. Notoriamente, em FBS é onde existe maior instabilidade dos lipossomas pois as proteínas do

soro interagem com as membranas lipídicas, destabilizando-as (Ishida, Okada et al. 2006). O facto das formulações que contêm lípidos ativos apresentarem uma maior instabilidade ao nível da retenção do fármaco, pode dever-se à sua composição. As formulações com estes lípidos contêm um menor teor de colesterol, conhecido por reduzir a fluidez da membrana dos lipossomas, o que combinado com os possíveis defeitos induzidos pelos mesmos no empacotamento dos lípidos, será responsável pela redução da retenção do fármaco no interior dos lipossomas (Senior 1987; Nagayasu, Uchiyama et al. 1999).

3.2. Avaliação da entrega intracelular de lipossomas contendo lípidos ativos

Para perceber se a presença dos lípidos bioativos na bicamada lipídica teria algum efeito sobre a libertação do conteúdo após entrega intracelular, foi estudada a libertação de calceína (marcador do conteúdo dos lipossomas) nas linhas celulares MDA-MB-435S e MDA-MB-231, após incubação destas com lipossomas contendo L1 ou L2. Como controlo foram usados lipossomas sem qualquer um destes lípidos.

Analisando a figura 3.3., pode observar-se que há diferenças significativamente visíveis entre as formulações não-vetorizadas e as formulações vetorizadas, para qualquer uma das condições utilizadas. É visível que entre as formulações vetorizadas não existem diferenças significativas para 1 h de incubação para qualquer uma das linhas utilizadas (Figura 3.3A e 3.3B). O mesmo se sucedeu com o aumento do tempo de incubação para 4 h, verificando-se um aumento do sinal de fluorescência, correspondendo a um aumento da entrega intracelular da calceína (Figuras 3.3C e 3.3D). Adicionalmente, como controlo do processo de produção dos lipossomas, foi incluída uma formulação preparada por hidratação de filme lipídico. Comparando os controlos (Ctr) com as restantes formulações, é perceptível que não existem diferenças entre o método de hidratação e o método de injeção de etanol, indicando que este último não influencia a partícula em termos de eficácia de entrega da carga (Figura 3.3B).

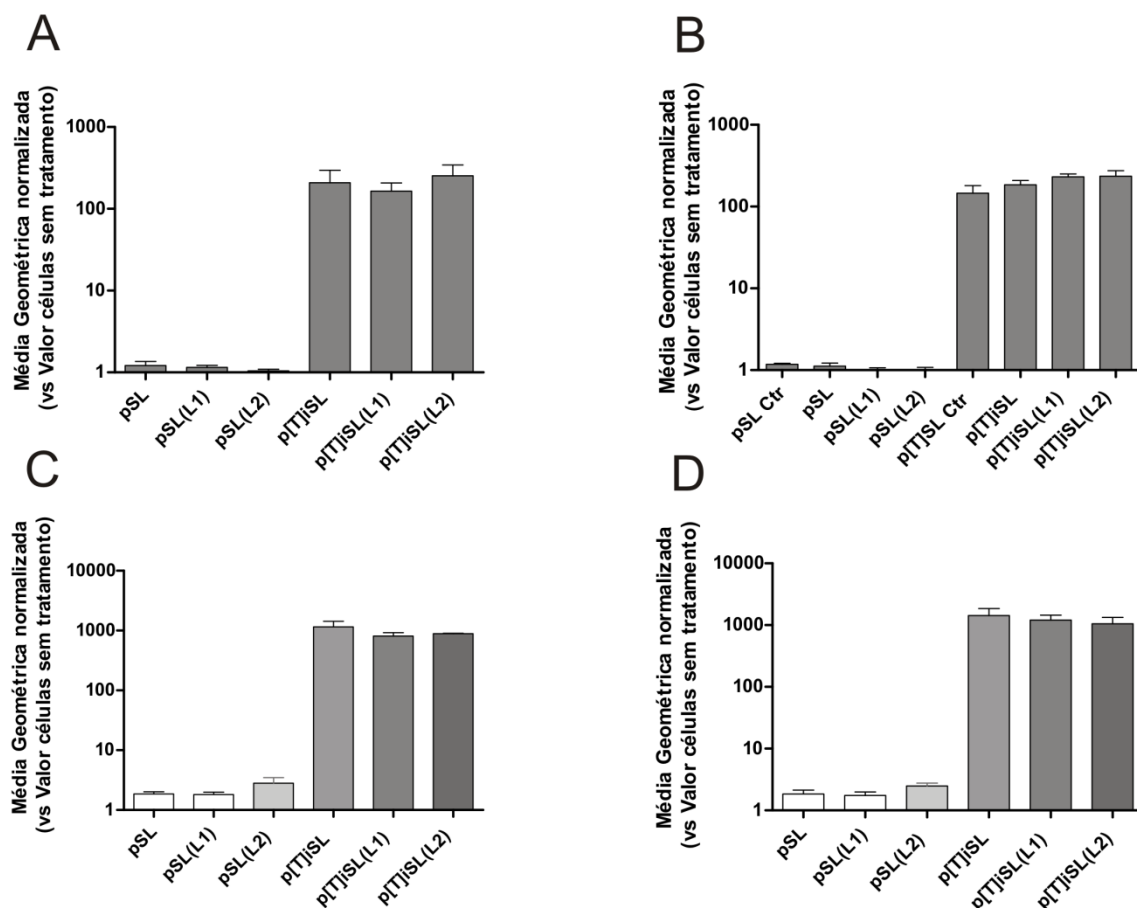


Figura 3.3. Ensaio de associação celular normalizados contendo, o lípido 1 (L1) ou o lípido 2 (L2). Duzentas mil células de cada linha foram incubadas durante 1 h ou 4 h, com lipossomas numa concentração de 0,05 mM de lípido total, contendo calceína, a 37°C. O gráfico A corresponde à associação celular da linha celular MDA-MB-231 com 1 h de incubação; B- Associação celular da linha celular MDA-MB-435S após incubação de 1 h; C- Associação celular da linha celular MDA-MB-231 com 4 h de incubação; D- Associação celular da linha MDA-MB-435 com 4h de incubação. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experiências. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$; determinado usando o teste estatístico *One-Way ANOVA*. **pSL Ctr e p[T]SL Ctr**- lipossomas produzidos pelo método de hidratação lipídica, encapsulando calceína, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; Lipossomas produzidos por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL**– lipossomas encapsulando calceína, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pSL(L1)** e **p[T]iSL(L1)** – lipossomas encapsulando contendo o lípido 1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pSL(L2)** e **p[T]iSL(L2)** – lipossomas encapsulando o lípido 2 não vetorizados ou vetorizados, respetivamente.

Observando os dados da Figura 3.3, é visível que o comportamento de qualquer uma das formulações utilizadas é muito semelhante para qualquer uma das linhas celulares.

Era presumível que a formulação que contém L1 apresentasse uma maior eficácia na entrega da carga do que a formulação que contém a L2. Isto é, uma vez que L2 apresenta um peso molecular superior, era esperado que para além de tornar a partícula mais estável, apresentasse maiores dificuldades na libertação do conteúdo do lipossoma, devido à sua baixa concentração de agregação crítica. Foi mostrado que quanto maior a concentração de

agregação crítica, maior é a transferência dos lípidos bioativos em estudo para as células em cultura. No entanto, isso não parece ter ocorrido, pois os lipossomas com L2 mostraram uma semelhante eficácia na entrega da carga. Importante de salientar é o facto de que a presença dos lípidos ativos na membrana do lipossoma não tem qualquer impacto na sensibilidade ao pH destas formulações, não afetando por isso a libertação do conteúdo, quando comparado com as formulações controlo. Tal é essencial para que a entrega combinada de fármacos, especialmente, aqueles que estão encapsulados no interior aquoso do lipossoma não seja comprometida.

3.3. Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas desenvolvidas

Para testar o potencial das nanopartículas e perceber se estas beneficiam da introdução dos lípidos bioativos, foram realizados ensaios de citotoxicidade e elaboradas curvas dose-resposta de forma a ser facilitada a análise dos dados. Para tal, as linhas celulares MDA-MB-231 e MDA-MB-435S foram incubadas com diluições em série das nanopartículas encapsulando a combinação durante 1 h, 4 h e 24 h.

A figura 3.4 apresenta os resultados de 1 h, 4 h e 24 h de incubação na linha MDA-MB-231. Para 1 h de incubação, a presença dos lípidos ativos na formulação não parece conduzir a um aumento do potencial citotóxico, uma vez que as curvas dose-resposta apresentam um perfil semelhante e valores de IC_{50} muito próximos (Figura 3.4A e 3.4B, e Tabela II, respetivamente). No entanto, observaram-se diferenças entre os valores médios de IC_{50} entre as formulações vetorizadas e não vetorizadas (Tabela I).

Já as figuras 3.4.C 3.4.D, representando a incubação com nanopartículas não direcionadas e vetorizadas, respetivamente, durante 4h, exibem um perfil diferente daquele correspondente a 1 h de incubação o que se traduz numa diminuição dos valores de IC_{50} (Tabela II). No entanto, para estas condições, a adição do LI apresenta vantagem, levando a um IC_{50} para a formulação p[T]iDLIII cerca de 2 vezes inferior ao IC_{50} fármaco lipossómico controlo (p[T]iSL), apesar da diferença não ser estatisticamente significativa (Tabela II). Não menos importante, a formulação contendo metade da quantidade de fármaco (p[T]iDLII2) apresenta um valor de IC_{50} muito semelhante ao da formulação controlo (Tabela II).

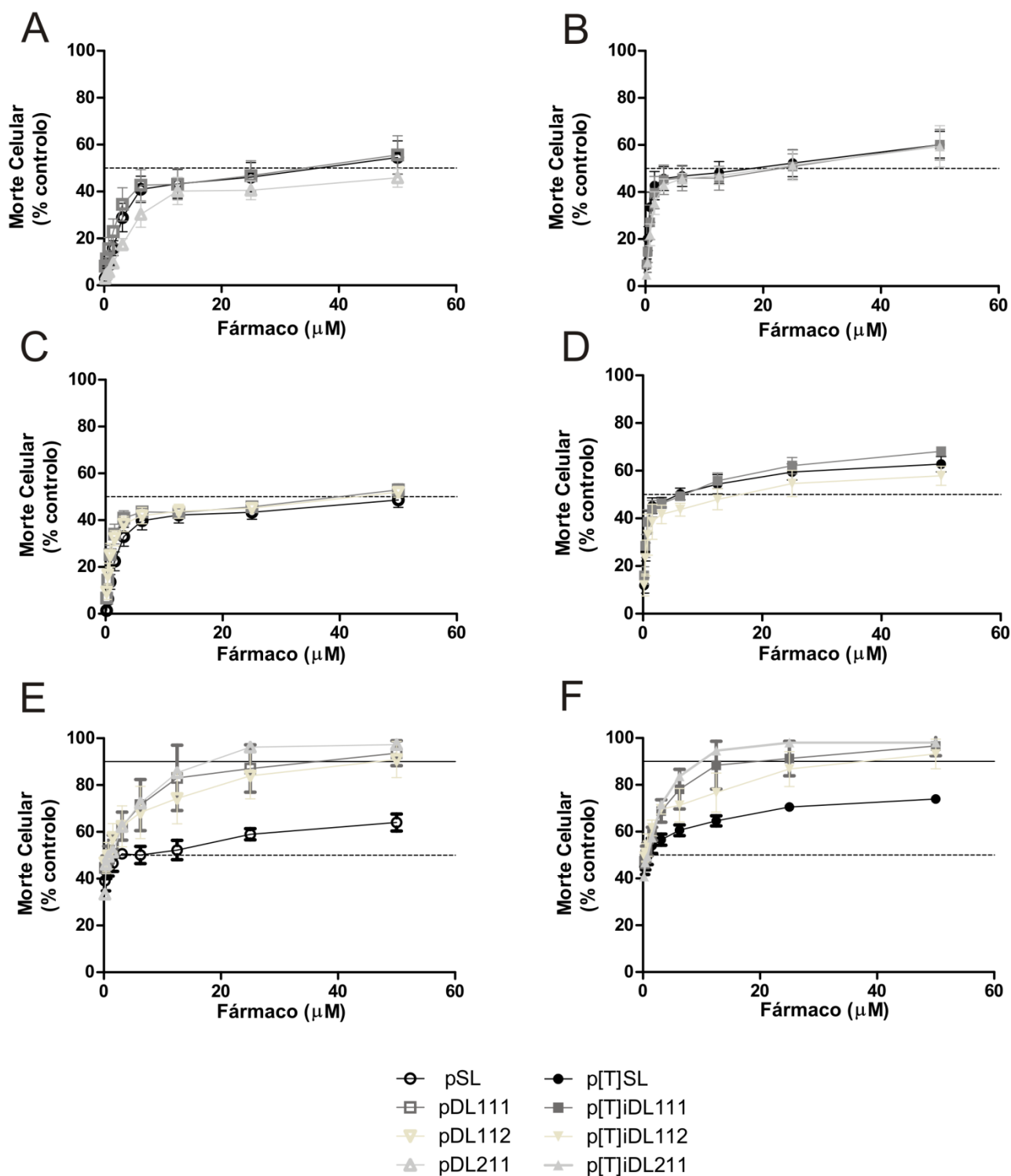


Figura 3.4. Ensaios de citotoxicidade utilizando lipossomas encapsulando o fármaco e um dos dois lípidos, 1 ou 2, com a linha celular MDA-MB-231. Oito mil células MDA-MB-231 foram incubadas com diluições em série da cada uma das formulações mencionadas durante 1 h, 4 h e 24 h a 37°C, ao fim das quais o meio foi substituído e a experiência prolongada por um total de 96 h. **A-** Incubação de 1 h, com nanopartículas não vetorizadas (apenas com as formulações: pSL, pDL111 e pDL211). **B-** Incubação de 1 h, com nanopartículas vetorizadas (apenas com as formulações: p[T]iSL, p[T]iDL111 e p[T]iDL211). **C-** Incubação de 4 h com nanopartículas não vetorizadas (apenas com as formulações: pSL, pDL111 e pDL112). **D-** Incubação de 4 h com nanopartículas vetorizadas (apenas com as formulações: p[T]iSL, p[T]iDL111 e p[T]iDL112). **E-** Incubação de 24 h com

nanopartículas não vetorizadas (com todas as formulações: pSL, pDL111, pDL112 e pDL211). F-Incubação de 24 h com nanopartículas vetorizadas (com todas as formulações: p[T]iSL, p[T]iDL111, p[T]iDL112, p[T]iDL211). Os dados representam a média \pm SEM de 3 experiências. As formulações apresentadas nesta figura, foram preparadas por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL** – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL111** e **p[T]iDL111** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL112** e **p[T]iDL112** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL211** e **p[T]iDL211** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L2 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente. **Linha a tracejado**- Linha indicadora do valor IC_{50} ; **Linha contínua**- Linha indicadora do valor IC_{90} .

Tabela II- Valores da citotoxicidade na linha celular MDA-MB-231 após os tempos de incubação de 1h, 4h e 24h.

		IC ₅₀ (μM) ± SD			
		MDA-MB-231	1h	4h	24h
Fármaco Lipossômico	pSL		24,71 ± 15,97	27,3 ± 10,6	4,05 ± 3,9
	p[T]iSL		12,65 ± 12,18	11,4 ± 8,9	0,86 ± 0,78
Combinação lipossômica citostático:lípido 1	pDL111		30,63 ± 31,98	24,2 ± 12,3	1,53 ± 1,9
	p[T]iDL111		17,40 ± 13,70	6,6 ± 5,3	0,53 ± 0,32
Combinação lipossômica citostático:lípido 1 (1:2)	pDL112			26,1 ± 16,7	0,96 ± 0,83
	p[T]iDL112			13,7 ± 9,5	0,45 ± 0,32
Combinação lipossômica citostático:lípido 2	pDL211		49,60 ± 35,40		0,73 ± 0,36
	p[T]iDL211		17,22 ± 11,96		0,69 ± 0,23

De forma a tentar compreender melhor o comportamento dos lipossomas, aumentou-se o tempo de exposição destes às células para 24 h, um tempo médio expectável para circulação de lipossomas PEGuilados *in vivo*. Os gráficos E e F da figura 3.4, são referentes ao tempo de incubação de 24 h, e como era esperado, os perfis dose-resposta revelaram-se bastante diferentes conduzindo a valores de IC_{50} mais baixos que os tempos de exposição anteriores (Tabela II). Porém, são de salientar dois aspetos importantes. Primeiro, a introdução dos lípidos ativos na formulação lipossómica permitiu que se atingisse um efeito citotóxico superior a 90%, inatingível por parte da formulação controlo contendo apenas o fármaco citostático. Em segundo lugar, o que foi descrito atrás é também aplicável à formulação

contendo metade deste agente (p[T]DLI12), ao qual adiciona uma redução de quase 2 vezes no valor de IC_{50} desta, relativamente à formulação controlo (Tabela II), um resultado bastante promissor e interessante do ponto de vista da redução da toxicidade. Estes resultados sugerem que estes lípidos ativos necessitam de estar em contacto com as células durante algum tempo para que o efeito toxico seja demonstrado.

A figura 3.5, é referente aos ensaios realizados com a linha celular MDA-MB-435s. Em consonância com os resultados obtidos com a linha MDA-MB-231, com 24 h de incubação, houve novamente um aumento na eficácia das formulações contendo LI, exibindo a formulação p[T]iDL111 o menor valor médio de IC_{50} ($0,39 \pm 0,28 \mu M$). No entanto, a formulação p[T]iDL112 demonstrou um valor de IC_{50} muito próximo daquela ($0,41 \pm 0,26 \mu M$) constituindo, mais uma vez, um resultado muito interessante, na medida em que esta encapsula metade da quantidade de fármaco citostático. Também semelhante ao resultado obtido com a linha MDA-MB-231, foi o facto de que as formulações contendo LI, vetorizadas, e ainda as não vetorizadas, excederam o valor de 90% de morte celular. Apesar do resultado com esta linha ter apresentado alguma inconsistência, facto é que estes se assemelham aos dados obtidos com a linha MDA-MB-231, indicando que eficácia das partículas poderá ser independente da linha celular utilizada.

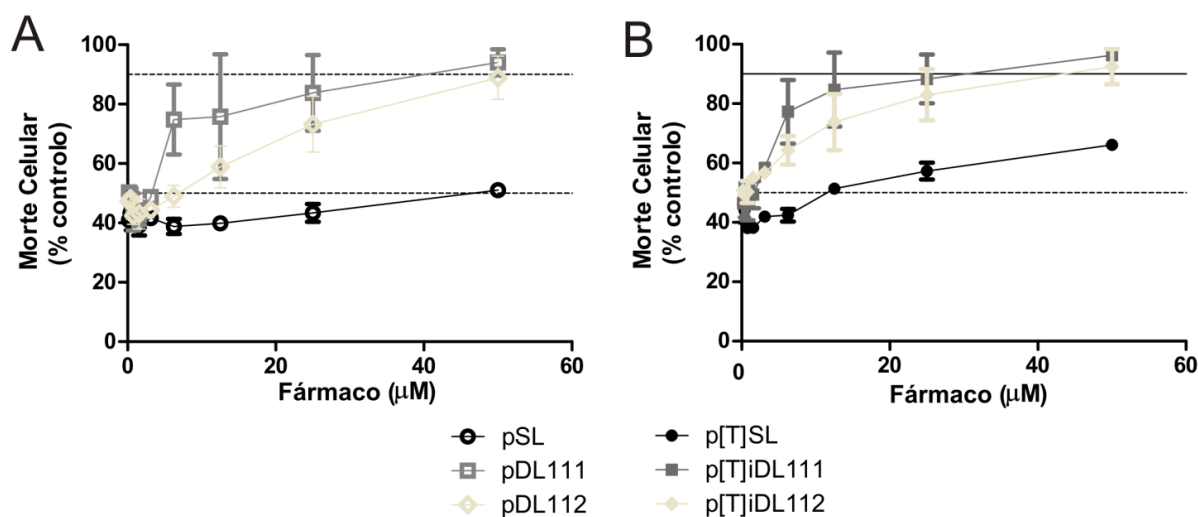


Figura 3.5. Ensaio de citotoxicidade utilizando lipossomas encapsulando o fármaco e o lípido I para a linha celular MDA-MB-435S. Oito mil células MDA-MB-435S foram incubadas com diluições em série de cada uma das formulações mencionadas durante 24h a 37°C, ao fim das quais o meio foi substituído e a experiência prolongada por um total de 96 h. **A** e **B** representam as curvas dose-resposta resultantes do tempo de exposição de 24 h com lipossomas não-vetorizados e vetorizados, respetivamente. As formulações aqui

apresentadas foram preparadas por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL** – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL111** e **p[T]iDL111** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL112** e **p[T]iDL112** - lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **Linha a tracejado**- Linha indicadora do valor IC_{50} ; **Linha contínua**- Linha indicadora do valor IC_{90} .

Tabela III- Valores da citotoxicidade na linha MDA-MB-435S após 24h de incubação.

	$IC_{50}(\mu M) \pm SD$	
	MDA-MB-435S	24h
	pSL	38,8 \pm 25,02
Fármaco Lipossómico	p[T]iSL	6,4 \pm 4,02
	pDL111	0,71 \pm 0,01
Combinação lipossómico citostático: lípido 1	p[T]iDL111	0,39 \pm 0,28
	pDL112	1,64 \pm 1,32
Combinação lipossómico citostático: lípido 1 (1:2)	p[T]iDL112	0,41 \pm 0,26

De acordo com os dados aqui apresentados, parece evidente que existe vantagem em co-encapsular os lípidos bioativos em estudo com o fármaco citostático, em lipossomas vetorizados. No entanto, tal parece depender do tempo de exposição das células alvo às nanopartículas contendo a combinação, uma vez que tempos curtos de incubação levam a diferenças mínimas entre estas e as formulações controlo, quer entre os perfis dose-resposta quer entre os valores de IC_{50} . Para um tempo de incubação de 24 h para estas linhas celulares, existe uma clara vantagem na combinação, uma vez que esta permitiu que se ultrapasse-se os 90% de morte celular, incluindo a formulação encapsulando metade da quantidade de fármaco (**p[T]iDL112**), o que se revelou impossível para a formulação controlo (**p[T]iSL**). No entanto, também as formulações não-vetorizadas beneficiaram da inclusão dos lípidos bioativos. Porém *in vivo*, é expectável que as formulações não vetorizadas não manifestem esta vantagem, uma vez que a acumulação no tumor não será tão eficiente.

Adicionalmente, sabe-se que os lípidos bioativos em estudo com peso molecular mais baixo apresentam uma maior citotoxicidade. Porém, neste caso, com um tempo de incubação de

24 h, o L2 (maior peso molecular que L1) co-encapsulado com o agente citostático, permitiu uma alteração significativa do perfil dose-resposta relativamente ao fármaco lipossómico, exibindo valores de citotoxicidade superiores a 90%, acompanhando os dados relativos a L1.

Em suma, parece haver de facto vantagem na utilização destes lípidos bioativos. Com a sua aplicação em lipossomas, é possível baixar as doses do citostático contido no interior dos lipossomas e alcançar perfis semelhantes de dose-resposta assim como a valores de IC_{50} muito próximos. Tal poderá ser importante no sentido de minimizar a toxicidade sistémica inerente aos agentes quimioterapêuticos.

3.4. Avaliação do impacto das nanopartículas desenvolvidas na viabilidade celular

Depois de conhecido o potencial citotóxico de cada uma das formulações, houve interesse em entender qual via de morte celular seria ativada (apoptose ou necrose) aquando da incubação com nanopartículas desenvolvidas. Pelo facto de se terem introduzido lípidos bioativos com potencial tóxico na composição dos lipossomas, era importante perceber se a apoptose seria o mecanismo de morte induzido nas células. Para tal, utilizaram-se dois marcadores de morte celular, a anexina-V e a 7-aminoactinomicina D (7-AAD). A anexina-V, uma vez na presença de concentrações fisiológicas de Ca^{2+} , tem uma elevada afinidade para fosfolípidos carregados negativamente, especialmente para a fosfatidilserina (PS), lípido que é exposto à superfície de células em apoptose. Com base na sua afinidade para com a PS, é normalmente utilizada em ensaios de citometria de fluxo na deteção da apoptose celular, logo foi um dos marcadores escolhidos (Dillon, Mancini et al. 2000). O 7-AAD é um composto químico fluorescente que tem uma especial afinidade para o ADN. Este intercala a dupla cadeia de ADN, e tem bastante afinidade para as regiões G-C, mas não entra em células intactas (Zembruski, Stache et al. 2012). Assim, após a incubação das células com as formulações desenvolvidas, a viabilidade celular foi determinada.

Observando o gráfico da figura 3.6, verifica-se que as formulações que apresentam o ligando à sua superfície, provocam maior morte celular, uma vez que o número de células inviáveis relativo é superior para estas formulações.

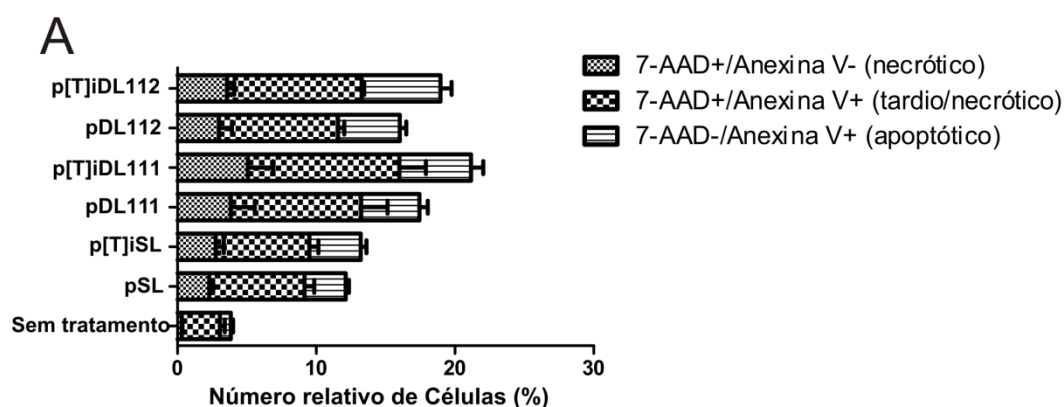


Figura 3.6. Análise do impacto das nanopartículas encapsulando o citostático e do lípido I (LI) na viabilidade celular. As células MDA-MB-231 foram incubadas com 1 μ M de fármaco encapsulado em lipossomas com ou sem LI, durante 4 h a 37°C, período ao fim do qual foi trocado o meio por meio sem lipossomas, sendo a experiência prolongada por 96h. A viabilidade foi analisada por citometria usando 7-AAD e Anexina V. Os dados representam a média \pm SEM de 3 experiências. As formulações aqui apresentadas foram preparadas por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL** – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL111** e **p[T]iDL111** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:LI 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL112** e **p[T]iDL112** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:LI 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente.

Relativamente ao mecanismo de morte ativado, os dados parecem indicar que as formulações vetorizadas que encapsulam LI (**p[T]iDL111** e **p[T]iDL112**) induzem um aumento do número de células apoptóticas assim como de células apoptóticas tardias/necróticas, quando comparado com a formulação controlo, apesar de não significativo (**p[T]iSL**) (Figura 3.6). Por outro lado, o número de células necróticas também parece aumentar relativamente aos controlos (Figura 3.6).

Na tentativa de compreender os resultados anteriores, as mesmas condições de cultura e de incubação foram utilizadas, mas, alternativamente, as células foram coradas com DAPI e analisadas por microscopia de fluorescência. Analisando a Figura 3.7A, é possível observar que todas as formulações causam uma grande redução do número de células relativamente ao controlo não tratado, como esperado. No entanto, é possível também notar que a incubação com formulações vetorizadas reduz de forma mais eficaz o número de células relativamente às formulações não vetorizadas, no entanto sem grande vantagem para as formulações contendo lípidos ativos, o que está de acordo com os dados de citotoxicidade para curtos tempos de incubação. Quando se analisa a geometria nuclear, a mesma tendência existe, levando as formulações vetorizadas a um aumento da área do núcleo assim como do tamanho das células quando comparado com as formulações não-vetorizadas (Figura 3.7 B e C). O facto das células apresentarem maiores dimensões assim como núcleos

com maior tamanho é consistente com um estado necrótico, pois estes são uma característica desta via de morte (Cummings, Wills et al. 2012).

Ambas experiências parecem indicar que a morte celular pode resultar de uma contribuição de ambos os mecanismos, quer necrose quer apoptose. Sabe-se que o agente citostático é capaz de induzir necrose de um modo dependente da dose. Por outro lado, os lípidos bioativos são pró-apoptóticos. Ora, os dados da viabilidade celular obtidos por citometria, indicam que a presença destes últimos aumenta o número de células apoptóticas assim como de necróticas/apoptóticas tardias, se bem que apenas marginalmente (Figura 3.6). Por outro lado, os dados de microscopia revelam apenas que as formulações vetorizadas induzem o aumento do tamanho de organelos, neste caso núcleo, e do tamanho celular, consistente com necrose (Figura 3.7). Esta diferença poderá estar relacionada com a elevada entrega do fármaco encapsulado pelas formulações vetorizadas (Figura 3.3). No entanto, o facto de haver apenas uma modesta contribuição dos lípidos ativos para o mecanismo de morte celular poderá dever-se às condições utilizadas, quer de dose reduzida quer de tempo de incubação curto, uma vez que as experiências de citotoxicidade revelam claramente a vantagem da combinação destes lípidos com o agente citostático. No entanto, em termos de citotoxicidade este benefício foi manifestado apenas para longos tempos de incubação (Figura 3.4 e 3.5), enquanto que nesta experiência de viabilidade celular foi somente experimentado o tempo de incubação de 4 h. Assim, apesar das experiências indicarem mecanismos celulares de morte muito próximos entre as diferentes formulações, será expectável que a alteração das condições experimentais, como o aumento de tempo e dose, levem a uma alteração do perfil de morte celular.

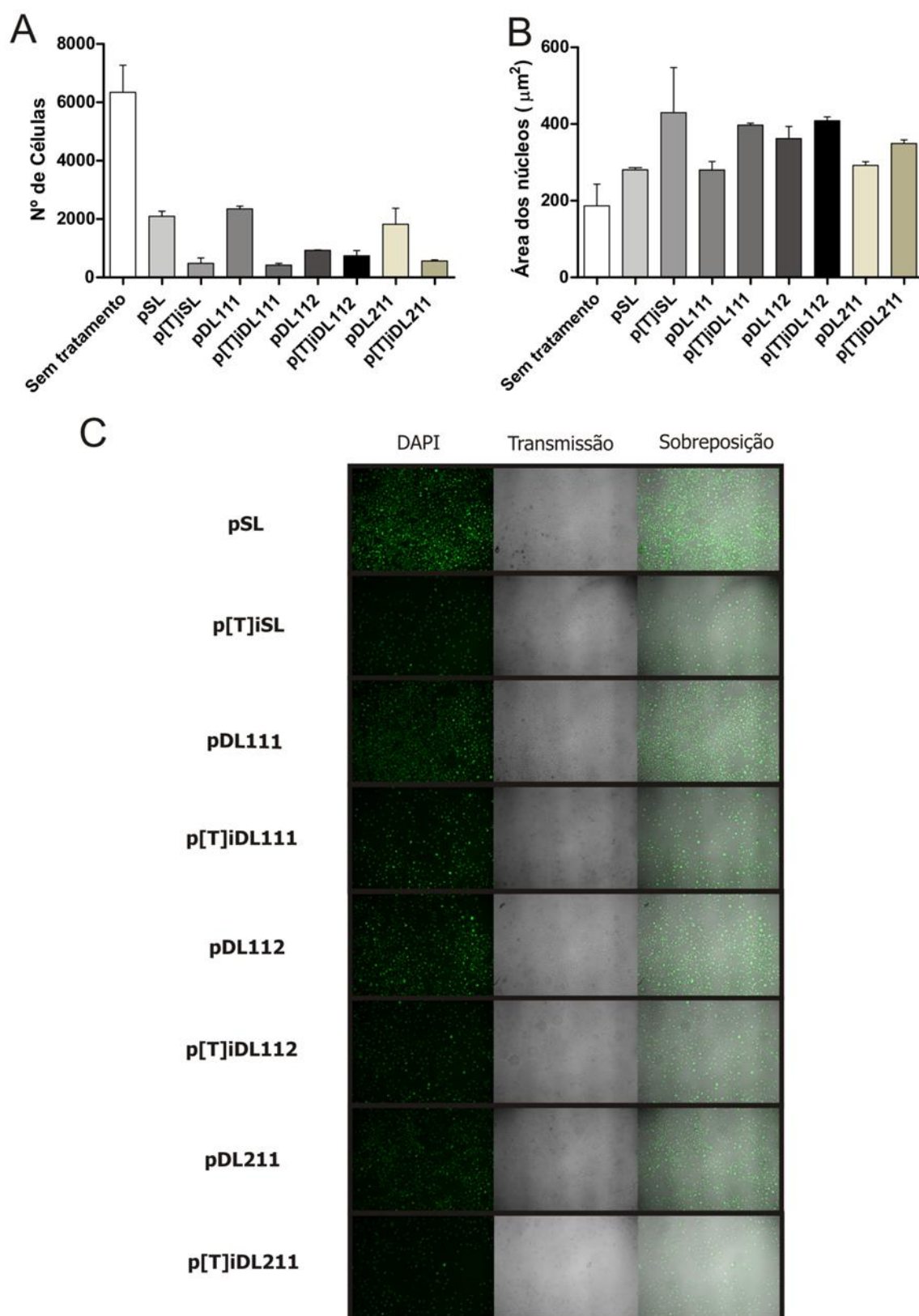


Figura 3.7. Análise microscópica da morfologia celular após incubação com as nanopartículas desenvolvidas. Células MDA-MB-435S foram tratadas com cada formulação à concentração de $1 \mu\text{M}$ de citostático durante 4 h a 37°C ; a experiência foi prolongada por um total de 96 h. **A** representa o número de células no final da experiência, em cada condição, após análise da marcação com DAPI. **B** representa a análise da geometria nuclear após marcação com DAPI. **C** – Imagens representativas de cada condição testada. Os dados mostrados

correspondem a uma experiência representativa. As formulações aqui apresentadas foram preparadas por injeção de etanol: **pSL** e **p[T]iSL** – lipossomas encapsulando o citostático, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL111** e **p[T]iDL111** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL112** e **p[T]iDL112** - lipossomas encapsulando o rácio citostático:L1 1:2, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente; **pDL211** e **p[T]iDL211** – lipossomas encapsulando o rácio citostático:L2 1:1, não vetorizados ou vetorizados, respetivamente.

Capítulo IV

Conclusões e Perspetivas Futuras

Conclusões e Perspetivas Futuras

Há uma grande necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novas estratégias de tratamento do cancro, incluindo sistemas de entrega de fármacos, na medida em que a qualidade de vida e a taxa de sobrevida dos doentes oncológicos tem que ser realmente melhorada. A eficácia terapêutica dos tratamentos que são utilizados atualmente é bastante comprometida, muitas vezes pelo desenvolvimento de resistência a estes, assim como aos efeitos adversos significativos provocados devido à ausência de ação específica sobre as células cancerígenas e à capacidade de distribuição por vários órgãos.

A nanotecnologia vem trazer algo promissor na entrega controlada de fármacos, uma vez que sistemas de entrega de fármacos nanotecnológicos de base lipídica estão aptos para encapsular agentes quimioterapêuticos, influenciando a sua farmacocinética e biodistribuição, essencial para controlar a sua toxicidade, por exemplo. A introdução de lípidos pro-apoptóticos na constituição das nanopartículas, permitiria um aumento da morte celular quando comparado com partículas carregadas apenas com o agente quimioterapêutico. Desta forma, este projeto procurou juntar vários componentes num só sistema de entrega de fármacos. Em nanopartículas PEGuiladas acrescentaram-se dois lípidos bioativos na sua composição lipídica; foi ainda encapsulado um agente quimioterapêutico, utilizado correntemente na quimioterapia convencional. O potencial desta inovadora estratégia foi demonstrado recorrendo a vários testes experimentais:

- A eficiência da entrega do fármaco e do direcionamento pôde confirmar-se em qualquer uma das nanopartículas, validada por citometria.
- A citotoxicidade do agente quimioterapêutico foi amplificada com o aumento do tempo de exposição das células às formulações vetorizadas co-encapsulando a combinação.
- Experimentou-se ainda, encapsular metade da quantidade de fármaco citostático por lipossoma na formulação contendo o lípido I (LI) na sua composição. Os resultados obtidos são merecedores de especial atenção, pois a citotoxicidade desencadeada por esta formulação foi muito semelhante às que continham o dobro da quantidade de fármaco. Com uma formulação com uma baixa dose de fármaco e que mantenha a eficácia terapêutica das restantes formulações é verdadeiramente um resultado promissor, na medida em que baixando as doses na medicação do doente

oncológico, os efeitos colaterais seriam também reduzidos, proporcionando uma melhor qualidade de vida ao doente sem comprometer o potencial do tratamento.

É, portanto, expectável uma melhorada eficácia terapêutica e segurança após a administração sistémica destas nanopartículas. Além disso, o facto de poder direccionar uma única plataforma nanotecnológica contendo uma combinação de agentes ativos para vários locais do microambiente tumoral, torna esta terapia anti-cancro inovadora e promissora.

Contudo, mais estudos são necessários para validar o potencial demonstrado *in vitro* pelas nanopartículas desenvolvidas num contexto de administração sistémica *in vivo*. Portanto, o próximo passo seria testar as nanopartículas noutros tipos de células tumorais. Através de estudos *in vivo*, seria possível validar o potencial terapêutico das formulações desenvolvidas, e adicionalmente, para entender como é que estas nanopartículas contendo a combinação se comportam no organismo, deveriam ser realizados ensaios de biodistribuição e farmacocinética. Adicionalmente, estudos acerca do mecanismo de ação também deveriam ser realizados, permitindo entender a forma como as nanopartículas promovem a sua ação.

Em suma, os resultados aqui apresentados, ainda que *in vitro*, são promissores e merecedores de um estudo mais intenso e aprofundado de forma a obter mais respostas acerca do funcionamento deste tipo de nanopartículas à base de lípidos e da atividade sobre o microambiente tumoral. Do ponto de vista clínico, estas nanopartículas parecem apresentar um grande potencial como fármacos anticancerígenos, embora um longo caminho esteja ainda por percorrer até à sua possível introdução na clínica.

Referências

- Atiqur Rahman, M. and M. Toi (2003). "Anti-angiogenic therapy in breast cancer." Biomed Pharmacother **57**(10): 463-470.
- Coleman, W. B. and G. J. Tsongalis (2006). "Molecular mechanisms of human carcinogenesis." EXS(96): 321-349.
- Colotta, F., P. Allavena, A. Sica, C. Garlanda and A. Mantovani (2009). "Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability." Carcinogenesis **30**(7): 1073-1081.
- Cuenca, A. G., H. Jiang, S. N. Hochwald, M. Delano, W. G. Cance and S. R. Grobmyer (2006). "Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics." Cancer **107**(3): 459-466.
- Cummings, B. S., L. P. Wills and R. G. Schnellmann (2012). "Measurement of cell death in Mammalian cells." Curr Protoc Pharmacol **Chapter 12**: Unit12 18.
- Daleke, D. L., K. Hong and D. Papahadjopoulos (1990). "Endocytosis of liposomes by macrophages: binding, acidification and leakage of liposomes monitored by a new fluorescence assay." Biochim Biophys Acta **1024**(2): 352-366.
- Danquah, M. K., X. A. Zhang and R. I. Mahato (2011). "Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature." Adv Drug Deliv Rev **63**(8): 623-639.
- Dean, M., T. Fojo and S. Bates (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." Nat Rev Cancer **5**(4): 275-284.
- Dicko, A., L. D. Mayer and P. G. Tardi (2010). "Use of nanoscale delivery systems to maintain synergistic drug ratios in vivo." Expert Opin Drug Deliv **7**(12): 1329-1341.
- Dillon, S. R., M. Mancini, A. Rosen and M. S. Schlissel (2000). "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation." J Immunol **164**(3): 1322-1332.
- Fernandez-Medarde, A. and E. Santos (2011). "Ras in cancer and developmental diseases." Genes Cancer **2**(3): 344-358.
- Ferrara, N. and R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature **438**(7070): 967-974.
- Folkman, J. (2003). "Angiogenesis and apoptosis." Semin Cancer Biol **13**(2): 159-167.
- Fukumura, D. and R. K. Jain (2007). "Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization." Microvasc Res **74**(2-3): 72-84.
- Gomes-da-Silva, L. C., J. S. Ramalho, M. C. Pedrosa de Lima, S. Simoes and J. N. Moreira (2013). "Impact of anti-PLK1 siRNA-containing F3-targeted liposomes on the viability of both cancer and endothelial cells." Eur J Pharm Biopharm.

- Hafez, I. M., S. Ansell and P. R. Cullis (2000). "Tunable pH-sensitive liposomes composed of mixtures of cationic and anionic lipids." Biophys J **79**(3): 1438-1446.
- Hafez, I. M. and P. R. Cullis (2000). "Cholesteryl hemisuccinate exhibits pH sensitive polymorphic phase behavior." Biochim Biophys Acta **1463**(1): 107-114.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-276.
- Ishida, T., Y. Okada, T. Kobayashi and H. Kiwada (2006). "Development of pH-sensitive liposomes that efficiently retain encapsulated doxorubicin (DXR) in blood." International Journal of Pharmaceutics **309**(1-2): 94-100.
- Jain, R. K. (1987). "Transport of molecules in the tumor interstitium: a review." Cancer Res **47**(12): 3039-3051.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." Nat Rev Cancer **9**(4): 239-252.
- Lasic, D. D. (1998). "Novel applications of liposomes." Trends Biotechnol **16**(7): 307-321.
- Lee, J. H. and A. Nan (2012). "Combination drug delivery approaches in metastatic breast cancer." J Drug Deliv **2012**: 915375.
- Lopes, M. B. (2003). "Angiogenesis in brain tumors." Microsc Res Tech **60**(2): 225-230.
- Maitani, Y., S. Igarashi, M. Sato and Y. Hattori (2007). "Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression." International Journal of Pharmaceutics **342**(1-2): 33-39.
- Mathieu, J., Z. Zhang, W. Zhou, A. J. Wang, J. M. Heddleston, C. M. Pinna, A. Hubaud, B. Stadler, M. Choi, M. Bar, M. Tewari, A. Liu, R. Vessella, R. Rostomily, D. Born, M. Horwitz, C. Ware, C. A. Blau, M. A. Cleary, J. N. Rich and H. Ruohola-Baker (2011). "HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells." Cancer Res **71**(13): 4640-4652.
- Mendonca, L. S., J. N. Moreira, M. C. de Lima and S. Simoes (2010). "Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment." Biotechnol Bioeng **107**(5): 884-893.
- Moreira, J. N., R. Gaspar and T. M. Allen (2001). "Targeting Stealth liposomes in a murine model of human small cell lung cancer." Biochim Biophys Acta **1515**(2): 167-176.

- Nagayasu, A., K. Uchiyama and H. Kiwada (1999). "The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs." Adv Drug Deliv Rev **40**(1-2): 75-87.
- Negrini, S., V. G. Gorgoulis and T. D. Halazonetis (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 220-228.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan (2000). "Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity." Eur J Biochem **267**(17): 5421-5426.
- O'Shaughnessy, J. A. (2003). "Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer." Clin Breast Cancer **4**(5): 318-328.
- Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nature Nanotechnology **2**(12): 751-760.
- Perche, F. and V. P. Torchilin (2013). "Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting." J Drug Deliv **2013**: 705265.
- Pinto, A. C., J. N. Moreira and S. Simoes (2009). "Ciprofloxacin sensitizes hormone-refractory prostate cancer cell lines to doxorubicin and docetaxel treatment on a schedule-dependent manner." Cancer Chemother Pharmacol **64**(3): 445-454.
- Pinto, A. C., J. N. Moreira and S. Simoes (2011). "Liposomal imatinib-mitoxantrone combination: formulation development and therapeutic evaluation in an animal model of prostate cancer." Prostate **71**(1): 81-90.
- Polyak, K. and R. Kalluri (2010). "The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(11): a003244.
- Quatromoni, J. G. and E. Eruslanov (2012). "Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer." Am J Transl Res **4**(4): 376-389.
- Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich and E. M. Sotomayor (2007). "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells." Annu Rev Immunol **25**: 267-296.
- Ramaswamy, S. (2007). "Rational design of cancer-drug combinations." N Engl J Med **357**(3): 299-300.
- Rodon, J., J. Perez and R. Kurzrock (2010). "Combining targeted therapies: practical issues to consider at the bench and bedside." Oncologist **15**(1): 37-50.
- Sapra, P. and T. M. Allen (2003). "Ligand-targeted liposomal anticancer drugs." Prog Lipid Res **42**(5): 439-462.
- Senior, J. H. (1987). "FATE AND BEHAVIOR OF LIPOSOMES INVIVO - A REVIEW OF CONTROLLING FACTORS." Crc Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems **3**(2): 123-193.
- Simoes, S., J. N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes and M. C. de Lima (2004). "On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times." Adv Drug Deliv Rev **56**(7): 947-965.

- Tennant, D. A., R. V. Duran, H. Boulahbel and E. Gottlieb (2009). "Metabolic transformation in cancer." Carcinogenesis **30**(8): 1269-1280.
- Thorling, E. B. (1996). "Obesity, fat intake, energy balance, exercise and cancer risk a review." Nutrition Research **16**(2): 315-368.
- Vaupel, P., F. Kallinowski and P. Okunieff (1989). "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review." Cancer Res **49**(23): 6449-6465.
- Vazquez, F. and P. Devreotes (2006). "Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction." Cell Cycle **5**(14): 1523-1527.
- Wang, A. Z., R. Langer and O. C. Farokhzad (2012). "Nanoparticle delivery of cancer drugs." Annu Rev Med **63**: 185-198.
- Weinberg, R. A. (1988). "Oncogenes and tumor suppressor genes." Trans Stud Coll Physicians Phila **10**(1-4): 83-94.
- Wong, M. L., A. Prawira, A. H. Kaye and C. M. Hovens (2009). "Tumour angiogenesis: its mechanism and therapeutic implications in malignant gliomas." J Clin Neurosci **16**(9): 1119-1130.
- Zembruski, N. C., V. Stache, W. E. Haefeli and J. Weiss (2012). "7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry." Analytical Biochemistry **429**(1): 79-81.